

THESIS

MUNICH

1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
ZWEIER NEUER TRYPSIN-INHIBITOREN

Gunther Hartwich



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM KLINISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
AN DER CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
ZWEIER NEUER TRYPSIN-INHIBITOREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gunther Hartwich
aus Gelsenkirchen

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. E. WERLE
Dekan:	Prof. Dr. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 12. 1965

Meiner Mutter
in Dankbarkeit gewidmet.

Herrn Professor Dr. Dr. E. Werle danke ich für die
Überlassung des Themas und die wohlwollende Unterstützung
während der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. H. Fritz,
der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Fräulein Dr. R. Vogel danke ich für zahlreiche Literatur-
hinweise.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.

- BAEE : Benzoyl-L-Arginin-Äthylester-Hydrochlorid
- BANA : N-Benzoyl-DL-Arginin-Naphthylamid
- BAPA : N- α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid-Hydrochlorid
- ΔE : Extinktionsänderung
- HPH : Hunde-Pankreas-Homogenat
- HPI : Hunde-Pankreas-Inaktivator
- HPS : Hunde-Pankreas-Saft
- IEP : Isoelektrischer Punkt
- KE : Kallikrein-Einheit = die Enzymmenge, welche die gleiche blutdrucksenkende Wirkung besitzt, wie 5 ml dialysierter Menschenharn, der einer Sammelmenge von 50 l entnommen wurde.
- KIE : Kallikrein-Inaktivator-Einheit = die Inhibitormenge, die von 2 KE die Hälfte zu hemmen vermag.
- MG : Molekulargewicht
- SBI : Sojabohnen-Inhibitor
- STI : Submaxillaris-Trypsin-Inaktivator
- TIE : Trypsin-Inaktivator-Einheit = die Menge Inaktivator, welche die Aktivität von 1 μ g Trypsin zu 50% zu hemmen vermag.

Inhaltsverzeichnis.

A. <u>Einleitung</u>	S. 1
B. <u>Theoretischer Teil</u>	
I. Die akute Pankreatitis und Therapie-Erfolge mit einem Trypsin-Kallikrein-Inaktivator	S. 1
II. Allgemeine Eigenschaften der Trypsin- Inaktivatoren	S. 10
III. Bisher bekannte Inaktivatoren	
a.) Pflanzliche Inaktivatoren	S. 16
b.) Tierische Inaktivatoren	S. 20
C. <u>Experimenteller Teil</u>	
I. Beschreibung der BAPA-Methode zur Bestimmung der Trypsin-Aktivität	S. 35
II. Charakterisierung eines Trypsin-Inaktivators aus Runkelrüben	S. 38
III. Untersuchungen über Trypsin-Inaktivatoren in Bauchspeicheldrüsen verschiedener Tiere	S. 43
IV. Isolierung des Inaktivators im Hunde-Pankreas aus Saft und Homogenat	S. 46
a.) Saftgewinnung	S. 47
b.) Präparation des Inaktivators aus Hunde-Pankreas-Saft (HPS)	S. 54
c.) Präparation des Inaktivators aus Hunde-Pankreas-Homogenat (HPH)	S. 60
V. Gemeinsame Eigenschaften der Inaktivatoren aus Saft und Homogenat	S. 74
D. <u>Diskussion</u>	
I. Abgrenzung des HPI gegen andere Trypsin-Inakti- vatoren	S. 86

II. Kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen anderer Autoren	S. 90
III. Kritische Betrachtungen zur Theorie der tryptischen Pankreatitis	S. 93
E. <u>Zusammenfassung</u>	S. 96
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	S. 99

A. Einleitung.

Durch die Therapie-Erfolge mit einem Trypsin-Kallikrein-Inaktivator (Trasylo1) bei der akuten Pankreatitis ist das Interesse an Trypsin-Inhibitoren im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit gestiegen.

Auch die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Trypsin-Inaktivatoren.

Zunächst wird ein kurzer Überblick über die bisher bekannten natürlich vorkommenden Trypsin-Inhibitoren gegeben.

Sodann wird über zwei neue Trypsin-Inaktivatoren berichtet, unter besonderer Berücksichtigung der Isolierung des Inaktivators aus Hundepankreas. Seine Eigenschaften werden beschrieben und seine mögliche Bedeutung für die Behandlung der akuten Pankreatitis wird diskutiert.

B. Theoretischer Teil.

I. Die akute Pankreatitis und Therapie-Erfolge mit einem Trypsin-Kallikrein-Inaktivator.

Über den Entstehungsmechanismus der akuten Pankreas-Nekrose besteht auch heute noch eine Vielzahl von Vorstellungen.

Die am häufigsten vertretene Theorie geht davon aus, daß es bei der akuten Pankreatitis zu einer tryptischen Selbstverdauung des Pankreas kommt.

Physiologischerweise werden die meisten Proteasen im Pankreas als inaktive Vorstufen gebildet und gelangen auch in dieser inaktiven Form durch das Gangsystem ins Duodenum.

Erst hier wird nun primär Trypsinogen zu Trypsin aktiviert, das seinerseits die meisten anderen Proenzyme aktiviert.

Dieser physiologische Vorgang, die "Enteropeptidase-Aktivierung" (nach der alten Nomenklatur ist Enteropeptidase gleich Enterokinase) soll bei der akuten Pankreatitis durchbrochen sein, d.h. in irgendeiner Form soll das Trypsinogen schon in den Pankreaszellen selbst oder im Gangsystem aktiviert werden. Das freigewordene Trypsin müßte zusammen mit den von ihm freigesetzten Enzymen in der Lage sein, das Pankreaszellprotein anzugreifen. Es wäre denkbar, daß es in sehr geringem Maße autokatalytisch zu einer Trypsin-Freisetzung kommt. Da aber die akute Pankreasnekrose ein so foudroyant verlaufendes Geschehen ist, müßte gefordert werden, daß die Trypsinogen-Aktivierung sehr rasch vor sich geht. Physiologischerweise ist dies aber nicht möglich, da zur autokatalytischen Trypsinogen-Aktivierung eine Mindestkonzentration von Ca^{++} -Ionen (4mVal/l) nötig ist (1) die nicht erreicht wird.

Welche anderen Faktoren bei einer möglichen Trypsin-Freisetzung eine Rolle spielen könnten, ist noch weitgehend ungeklärt. Zwar kann es durch Stauung im Gangsystem (z.B. bei Cholelithiasen, Papillitis oder Papillenödem) zum Eindringen von Galle kommen, jedoch hat die Galle nur einen cytolytischen und cytotoxischen Effekt, vermag dagegen Trypsinogen nicht zu aktivieren.

Ob Bakterien-Proteinasen bei entzündlichen Vorgängen eine Trypsinogen-Aktivierung zu bewirken vermögen, ist ebenfalls ungeklärt.

Für eine mögliche intermediäre Aktivierung von Trypsinogen

zu Trypsin können aber dennoch einige Tatsachen angeführt werden:

- 1.) Abnahme von Trypsinogen und Chymotrypsinogen in autolytischem Pankreasgewebe.
- 2.) Aktivierung von Kallikreinogen zu Kallikrein.
- 3.) Aktivierung der Procarboxypeptidase.

Alle diese Aktivierungsvorgänge werden durch Trypsin katalysiert.

Unabhängig davon, ob überhaupt und auf welche Weise es zu einer Trypsin-Freisetzung im Pankreas kommen kann, ist freies Trypsin nicht in der Lage, ungeschädigte Zellen anzugreifen. Der sogenannte Verdauungsschutz der Zellen (2) ist an ein Intaktsein ihres Stoffwechsels gebunden. Die Pankreaszellen müßten also vorgeschädigt sein, damit überhaupt aktives Trypsin zur Wirkung kommen kann.

Eine Schädigung des Zellstoffwechsels dürfte am häufigsten durch eine Abflußbehinderung des Pankreassekretes verursacht werden, die zu einer reversiblen Ödembildung führt, wodurch es zu einer Stauungsschädigung der Zellen kommen könnte. Außer dieser Schädigung durch Stauung kommen als weitere Noxen in Betracht: Störung der Blutversorgung in einzelnen Gebieten (Ischämie und Infarzierungen) und entzündliche oder toxische Vorgänge. Neben nervösen Einflüssen werden auch allergische Faktoren wie das Schwartzmann-Phänomen und die Arthus-Reaktion als Ursache diskutiert. Nur bei einer Kombination der geschilderten Faktoren, d.h. wenn es zu einer Trypsin-Freisetzung käme auf dem Boden eines vorgeschädigten Pankreas, könnte eine akute Pankreas-

nekrose die Folge sein.

Dieser Grundbedingung wird in manchen Pankreatitis-Theorien nicht Genüge getan. So läßt die sogenannte "Reflux-Theorie" außer Acht, daß das Trypsin nur vorgeschädigte Zellen anzugreifen imstande ist, die sogenannte "vasculäre Theorie" genügt sich mit einer Zellschädigung, macht aber keinerlei Angaben über eine mögliche Trypsin-Freisetzung. Einzelheiten über verschiedene Pankreatitis-Theorien werden in einer noch nicht veröffentlichten Arbeit dieses Instituts diskutiert (3).

Die experimentelle Pankreatitis am Hund führte nach POPPER (4) nur dann zu einer Pankreasnekrose, die im histologischen Bild der beim Menschen beobachteten Pankreatitis entspricht (Fettgewebsnekrosen im Pankreas und großen Netz, Parenchymnekrosen, die teilweise hämorrhagisch sind), wenn folgende drei Bedingungen erfüllt waren:

- 1.) Stop im Ausführungsgangsystem
- 2.) Stoffwechsellinderung der Zellen
(Zellschädigung auf Grund von Durchblutungsstörungen)
- 3.) Sekretionsreiz
(als auslösende Ursache)

Dies entspricht durchaus der geschilderten Theorie vom Entstehungsmechanismus der menschlichen Pankreatitis, wenn man bedenkt, daß bei einem vorgeschädigten Gewebe gerade nach fettreichen Mahlzeiten oder Alkoholabusus und dem dadurch bedingten verstärkten Sekretionsreiz eine akute Pankreasnekrose zum Ausbruch kommen kann.

Neuerdings werden vielfach Zweifel angemeldet, ob dem

Trypsin überhaupt die entscheidende Rolle bei der akuten Pankreatitis zukommt; denn WERLE et al. (5), aber auch andere Autoren konnten nachweisen, daß bei der experimentellen Pankreatitis am Hund zu keinem Zeitpunkt nennenswerte Mengen an Trypsin im Pankreashomogenat zu finden sind.

Zwar kann bei Inkubieren des Homogenats bei 37°C eine laufende Abnahme des Trypsinogens beobachtet werden, jedoch kann aktives Trypsin nicht nachgewiesen werden.

Auch vermag Trypsin in verschiedenen Versuchsanordnungen als aktives Enzym zugesetzt die erwarteten pathologischen Veränderungen nicht auszulösen.

Dies schließt jedoch die primäre Trypsinogenaktivierung als folgenschwerste Entgleisung bei der Pankreatitis nicht aus. Schon seit langem ist bekannt (6), daß sich der Organismus vor tryptischer Verdauung durch spezifische Inhibitoren zu schützen weiß. Auch im Pankreas gibt es einen Trypsin-Inaktivator, der in der Lage ist, etwa entstehendes Trypsin abzufangen und damit zu inaktivieren. So ist es nicht verwunderlich, daß man im "Pankreatitis-Homogenat" keine freie tryptische Aktivität findet, wohl aber eine Abnahme des Hemmkörpergehaltes.

Da die Pankreas-Trypsin-Inaktivatoren eine recht große Hemmkapazität besitzen, ist es von vornherein unwahrscheinlich, in einem Pankreatitishomogenat freies Trypsin zu finden, selbst wenn es im Organ örtlich zu einer Trypsin-Freisetzung gekommen sein sollte; denn in einem Homogenat sind die Strukturen weitgehend zerstört, sodaß etwaig entstandenes

freies Trypsin aus erkrankten Bezirken ohne weiteres vom Inaktivator gesunder Bereiche abgefangen werden könnte.

Nach WERLE u. TRAUTSCHOLD ist daher ein Pankreashomogenat als Modell einer Pankreatitis ungeeignet.

Wenn man von der Zellstruktur ausgeht, so findet man, daß die inaktiven Vorstufen der proteolytischen Enzyme in sogenannten Zymogengranula vorliegen (7), deren Struktur sehr labil ist, sicherlich an ein Intaktsein des Zellstoffwechsels gebunden. Schon bei einer geringen Schädigung des Zellstoffwechsels kommt es zu einer pathologischen Auflösung der Zymogengranula. Wenn zusätzlich eine Aktivierung der Proenzyme eintritt, d.h. primär eine Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin erfolgt, das seinerseits den größten Teil der Proenzyme zu aktivieren vermag, so könnte die Selbstverdauung des Pankreas die Folge sein.

Ginge man davon aus, daß Enzyme und Inhibitor in der Zelle in räumlich getrennten Partikeln vorliegen (8), so wäre es denkbar, daß das freigewordene Trypsin im Zellbereich seine katalytische Funktion ausüben kann, ohne schlagartig vom Hemmstoff inaktiviert zu werden. Erst beim Zusammenstoß von Trypsin- und Inaktivatormolekülen käme es zum Stillstand der Katalyse.

Die eigentliche Organproteolyse erfolgt durch Proteasen, Peptidasen oder Kathepsine des Pankreas, die selbst nicht durch die Pankreas-Trypsin-Inhibitoren gehemmt werden können. Ihre Freisetzung und Aktivierung jedoch könnte durch die Trypsin-Inhibitoren eingedämmt oder verhindert werden, falls sie durch Trypsin aktiviert werden.

Zur Aktivierung dieser Enzyme würde eine geringe, im geschädigten zellulären oder interstitiellen Bereich örtlich wirksame Trypsinmenge genügen, die sich dem experimentellen Nachweis entzieht, da das Trypsin beim Homogenisieren vom vorhandenen Inhibitor abgefangen wird.

Es muß aber die primäre Trypsinogenaktivierung nicht unbedingt im Vordergrund stehen. Diese könnte ebensogut von der geschädigten Zelle ihren Ausgang nehmen, soweit die Zellkathepsine und unspezifischen "Cytokinasen" in der Lage sind die Zymogene zu aktivieren. In diesem Falle würde den Trypsin-Inaktivatoren eine andere, bisher unbekannte Aufgabe zufallen, soweit sie nicht gleichzeitig Enzyme zu hemmen vermögen, die Kinine liberieren und damit das Kininsystem ausschalten.

Kinine sind niedermolekulare, pharmakologisch hochaktive Polypeptide, deren Auffindung und Beschreibung vornehmlich auf Arbeiten von WERLE und seiner Mitarbeiter zurückgeht. Kinine wirken kontraktionserregend auf glattmuskuläre Organe, wie Uterus, Darm etc., erhöhen die Gefäßpermeabilität und bewirken durch Gefäßdilatation eine Blutdrucksenkung. Durch Reizung von Nervenendigungen wirken sie schmerzzeugend.

Plasmakinine werden enzymatisch von Kininogenasen (z.B. Kallikrein) aus einem bestimmten Globulin des Blutplasmas abgespalten. Kinine können alle Erscheinungen einer Entzündung hervorrufen; ihre Beteiligung am Zustandekommen von Entzündungen ist daher sehr wahrscheinlich. Auch intensivieren sie auf Grund ihrer gefäßpermeabilitätssteigernden Wirkung die pathologischen Prozesse.

Auch bei der akuten Pankreatitis spielen Kinine eine wichtige Rolle. Dabei kommt es im Pankreas zu einer Aktivierung von Kallikreinogen zu Kallikrein und zum Übertritt von Kallikrein ins Blut. Hier setzt das Kallikrein das Kinin Kallidin frei, das einen Blutdruckabfall herbeiführt, der so stark sein kann, daß es zum Bild des Schocks kommt, einer gefürchteten Komplikation der Pankreatitis.

Die akute Pankreatitis, ein dramatisches Geschehen, das in kürzester Zeit zur Nekrose führt, war lange Zeit einer Therapie nicht zugänglich.

Nach Auffindung natürlich vorkommender Trypsin- und Kallikrein-Inhibitoren pflanzlichen und tierischen Ursprungs wurde ihre klinische Anwendbarkeit geprüft.

Als besonders wirksam erwiesen sich Gaben eines Inhibitors aus Rinderparotis (Trasylol der Fa. Bayer), eines niedermolekularen Inaktivators von Trypsin, Kallikrein und Chymotrypsin. Mit Hilfe dieses Hemmstoffes konnte in sehr vielen Fällen durch Inaktivierung des Kallikreins ein Blutdruckabfall verhindert werden, so daß Schockzustände vermieden wurden. Die Autolyse des geschädigten Pankreas konnte - wenn auch nur geringgradig - verlangsamt werden. Subjektiv ließen sich die mit der akuten Pankreatitis einhergehenden Schmerzen bekämpfen.

Trasylol kann als relativ kleines Molekül rasch die Zellmembranen durchdringen und an den Ort der Zymogenaktivierung gelangen, um dort das möglicherweise freigewordene Trypsin zu hemmen, bzw. den Aktivierungsvorgang zu verlangsamen.

Die Erfolge, die mit Trasylol im Tierexperiment und bei

klinischer Anwendung erzielt werden konnten, haben eine Kininbeteiligung bewiesen und die Theorie der tryptischen Autolyse wahrscheinlicher gemacht. Auch ermutigen sie dazu, auf dem Gebiet der Trypsin-Inaktivatoren weiterzuforschen und zu prüfen, ob weitere Inhibitoren der Therapie zugeführt werden können.

Schon seit der Jahrhundertwende weiß man, daß in verschiedenen pflanzlichen und tierischen Geweben Stoffe mit Proteincharakter vorkommen, die Trypsin zu hemmen vermögen. Die moderne Forschung auf diesem Gebiet setzt 1931 mit der Pionierarbeit von KUNITZ (9) und NORTHROP (10) ein, die Trypsin, Trypsinogen, Chymotrypsin und Chymotrypsinogen kristallin darstellten und damit die Voraussetzung schufen, die Hemmwirkung der Trypsininhibitoren genau zu untersuchen. Zur gleichen Zeit gelang es ihnen, aus Rinderpankreas einen Trypsin-Inaktivator und dessen Komplex mit Trypsin in kristalliner Form zu isolieren.

Inzwischen sind die Methoden verbessert und eine Reihe von Inaktivatoren in reiner Form erhalten worden.

1954 veröffentlichten LASKOWSKI et al. (11) ein Übersichtsreferat, in dem sie die Eigenschaften der bis dahin bekannten natürlich vorkommenden Hemmstoffe eingehend diskutierten und die wichtigsten Inhibitoren charakterisierten.

Eine noch umfassendere Übersicht über die bis 1964 bekannten Hemmstoffe geben VOGEL und TRAUTSCHOLD (12) in einer noch nicht veröffentlichten Arbeit dieses Instituts.

II. Allgemeine Eigenschaften der Trypsin-Inaktivatoren.

Bei den natürlich vorkommenden Trypsin-Inaktivatoren handelt es sich um Proteine bzw. größere Polypeptide. Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden, deren eine ein Molekulargewicht bis zu 10 000 besitzt. Gemeinsame Charakteristika dieser Gruppe sind Löslichkeit und Stabilität in 2,5%iger Trichloressigsäure (TES), Zusammensetzung nur aus α -Aminosäuren und Fehlen von Tryptophan. Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes (IEP) bestehen dagegen große Unterschiede. Hierher gehören z.B. die von KUNITZ (25) und KAZAL (203) beschriebenen Trypsin-Inaktivatoren aus Rinderpankreas und der Inhibitor aus Lima-Bohnen (13).

Zu einer zweiten Gruppe lassen sich Inaktivatoren von einem Molekulargewicht um 20 000 zusammenfassen, die unlöslich sind in TES (z.B. der Inaktivator aus Sojabohnen und der Blutplasma-Inhibitor). In beiden Gruppen finden sich Inaktivatoren aus pflanzlichem als auch aus tierischem Material.

Die Aktivität der Hemmstoffe läßt sich mit physikalisch-chemischen Methoden nicht direkt messen. Man kann aber indirekt aus der Größe der Abnahme der tryptischen Aktivität auf die Menge des hinzugefügten Hemmstoffes schließen.

Als geeignete Substrate zur quantitativen Bestimmung der Trypsinaktivität konnten sich in letzter Zeit gegenüber den natürlichen Substraten Kasein und Hämoglobin bestimmte synthetische Verbindungen durchsetzen, aus denen bei der Spaltung durch Trypsin eine farbige Komponente freigesetzt wird, die direkt photometrisch gemessen werden kann.

Die synthetischen Substrate haben den Vorteil, daß man auch kleinste Mengen von Trypsin sicher nachweisen kann. Bewährt haben sich BAPA (N- α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid-Hydrochlorid), BANA (N-Benzoyl-DL-Arginin-Naphthylamid), BAEE (Benzoyl-L-Arginin-Äthylester-Hydrochlorid) und TAME (p-Tosyl-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid).

Bei Verwendung des Trypsins muß man sich darüber im Klaren sein, daß Trypsin im Kühlschrank mit der Zeit an Aktivität verliert, sodaß man nicht ohne weiteres Vergleiche hinsichtlich der Hemmkapazität verschiedener Inaktivatoren anstellen kann; denn die Inhibitoren können nur aktives Trypsin hemmen (14). Für den Vergleich der Hemmkapazität verschiedener Inaktivatoren ist es am günstigsten, als Standard ein Trypsin zu verwenden (11), das nach der Methode von KUNITZ (15) hergestellt und dessen Aktivität am Tage der Experimente überprüft wird.

Außerdem sind Vergleiche verschiedener Inaktivatoren nur dann möglich, wenn man wirklich reine Präparate prüft. Viele Diskrepanzen haben sich ergeben durch Verwendung von Präparaten mit verschiedenem Reinheitsgrad. Als Reinheitskriterien können gelten 1.) die "solubility-method" (11), 2.) die Kristallisation des Inhibitors. Weniger verlässliche Ergebnisse lassen sich nach LASKOWSKI (11) erzielen, wenn das Präparat nicht kristallisiert werden konnte und Reinheit nur auf Grund elektrophoretischer Analysen oder Sedimentationsbestimmungen angenommen wurde.

Fehlermöglichkeiten ergeben sich durch Verunreinigungen mit Komponenten niederen Molekulargewichtes, Verunreinigungen mit UV-absorbierenden Substanzen oder durch Salze.

Ist das Präparat rein, so kann es mit Hilfe der Endgruppenbestimmung und Aminosäurenanalyse weitgehend charakterisiert werden. Die Aminosäurezusammensetzung ist allerdings erst von wenigen Inhibitoren bekannt, so vom Kunitz'schen Rinderpankreas-Trypsin-Inaktivator (16), vom Lima-Bohnen-Inaktivator (17) und vom Ovomucoid (18).

Die Elementanalyse zur Charakterisierung ist wegen der Ähnlichkeit im Aufbau aller Proteine wenig sinnvoll.

KUNITZ (15) führte eine sehr einfache Methode ein, die Konzentration von reinen Proteinen in wäßriger Lösung zu bestimmen. Sie besteht in der Messung ihrer "spezifischen Absorption" bei einer Wellenlänge von 280 m μ . Jedes Protein ist durch den reziproken Wert der spezifischen Absorption charakterisiert. Die Einheit des optischen Faktors ist definiert als der reziproke Wert der optischen Dichte einer 0,1%igen Proteinlösung bei 280 m μ in einer Küvette von 1 cm Durchmesser. Die Absorptionsintensität ändert sich mit dem pH-Wert, der deswegen angegeben werden muß. Im sauren Bereich ist diese Änderung aber so gering, daß sie vernachlässigt werden kann. Eine Tabelle mit Angaben des optischen Faktors einiger Inhibitoren findet sich bei LASKOWSKI (11), S. 216.

Natürlich vorkommende Trypsin-Inaktivatoren bilden mit Trypsin einen Komplex, der weder tryptische noch inhibitorische Aktivität besitzt. Dabei reagiert jeweils ein Trypsin-Molekül mit einem Inaktivator-Molekül. Diese von KUNITZ aufgestellte 1+1 - Hypothese wurde in der Praxis mehrfach bestätigt (19). Da sich äquimolare Mengen Trypsin und Inhibitor an der Komplexbildung beteiligen, ergibt sich aus der Menge

Trypsin, die von einer Gewichtseinheit Inaktivator gehemmt wird, das Verhältnis der Molekulargewichte. Dieses Verhältnis variiert zwar etwas je nach dem zur Trypsinbestimmung verwendeten Substrat (17) - die trypsinhemmende Aktivität des gleichen Inhibitors ist höher, wenn man statt natürlicher synthetische Substrate verwendet - jedoch ist in beiden Fällen die Hemmung stöchiometrisch. Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Chymotrypsinhemmung beobachtet (20).

Weitere Beweise für die Richtigkeit der Additions-Komplex-Theorie liefert die Bestimmung des Molekulargewichtes und des IEP. Es konnte gezeigt werden, daß das Molekulargewicht des Komplexes genau der Summe der Molekulargewichte der Einzelkomponenten entspricht, und daß der IEP des Komplexes in der Mitte der Einzelkomponenten liegt (11).

In kristalliner Form sind bisher drei Trypsin-Inhibitor-Komplexe erhalten worden, und zwar der Trypsin-Komplex mit Soja-Bohnen-Inhibitor (10), mit dem Kunitz-Inhibitor und mit dem Colostrum-Inhibitor.

Die Komplexbildung ist ein reversibler Vorgang. Außerhalb des pH-Wertes, bei dem der Trypsin-Inaktivator-Komplex stabil ist, dissoziiert er wieder, jedoch verhalten sich die Komplexe in einem weiten pH-Bereich wie ein einheitliches Protein mit nur sehr geringer Dissoziationsneigung.

Die Fähigkeit der natürlich vorkommenden Trypsin-Inaktivatoren, mit Trypsin einen stabilen Komplex zu bilden, wurde methodisch erfolgreich benutzt, um einen unbekannten Trypsin-Inhibitor zu isolieren, indem man zunächst den Komplex isolierte und dann den Inaktivator abtrennte.

Die einfache 1:1 - Wechselwirkung wird in manchen Fällen (Kazal-Inaktivator und Ovomucoid) durch das sogenannte Phänomen der "temporären Hemmung" (temporary inhibition (11, 22)) kompliziert. Es zeigte sich nämlich, daß diese Inaktivatoren zwar auch einen Komplex mit Trypsin bilden, daß sie aber trotzdem nicht resistent gegen eine tryptische Verdauung sind (22). Es kommt hierbei zu einer geringen Dissoziation des Komplexes. Der Inaktivator wird durch das freigesetzte Trypsin zerstört. Unter diesem Phänomen der temporary inhibition versteht man ein System, bei dem der Inaktivator gleichzeitig Substrat für das Enzym ist. Die physiologische Bedeutung dieses Vorgangs ist nicht bekannt. Um den Mechanismus zu erklären wurde im Hinblick auf die Kinetik die Hypothese aufgestellt, daß sich ein Molekül Inaktivator mit zwei Molekülen Trypsin zum Komplex Trypsin-Inaktivator-Trypsin verbindet, der dann in zwei Trypsinmoleküle plus Produkte zerfällt (23). Diese Hypothese konnte bestätigt werden (19).

Bei der Frage nach der Art der Hemmung ergaben sich zunächst Differenzen; denn viele Autoren fanden eine nicht kompetitive Hemmung, wenn sie natürliche Substrate zur Trypsinbestimmung verwendeten (24 - 26). GREEN (14) fand aber, daß die Affinität von Trypsin zu synthetischen Substraten erheblich größer ist als zu natürlichen, und daß es bei Verwendung von synthetischen Substraten deshalb zu einer kompetitiven Hemmung kommt (27). Es liegt daher der Schluß nahe, daß der Inhibitor durch die Komplexbildung die enzymatisch wirksame Gruppe des Trypsins zu blockieren vermag. Sicherlich sind freie Aminogruppen des Hemmstoffes

in die Komplexbindung einbezogen, da die Menge von freiem Aminostickstoff im Komplex kleiner ist als der Summe der Komponenten entspricht (15, 17, 28), doch sind die Kenntnisse über das "aktive Zentrum" der Inhibitoren trotz zahlreicher Substitutionsversuche (17, 26) noch sehr gering.

Die Trypsin-Inaktivatoren reagieren verschieden schnell mit Trypsin. Fast alle vermögen das Trypsin in kürzester Zeit zu inaktivieren. Eine Ausnahme macht der Rinderpankreas-Inaktivator von Kunitz, bei welchem die Reaktion erst nach 5 Minuten vollständig abgelaufen ist (23). (nach (6, 192) : 30 Minuten). GREEN (14) konnte diesen Sachverhalt nach der Methode von McLaren (28) besonders anschaulich darstellen. Zu einer Mischung von Trypsin + BAEE + CaCl_2 in Puffer gab er verschiedene Inhibitoren. Die Hemmkurven ergaben folgendes Bild:

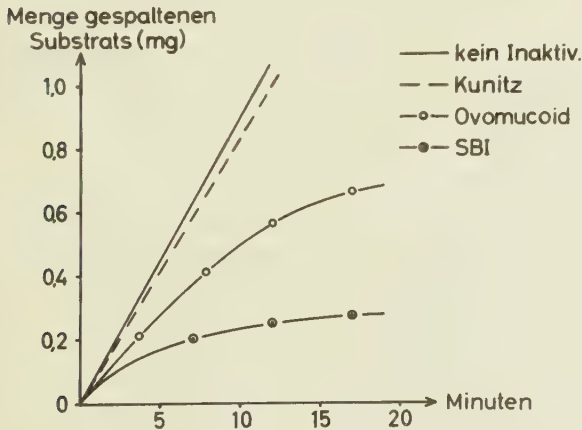


Abb. - 1 -

Trypsin-Inaktivator-Komplexbildung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.

Es ist aus der Abbildung deutlich zu sehen, daß der Rinderpankreas-Inaktivator von Kunitz am langsamsten mit Trypsin reagiert, daß aber auch das Ovomucoid eine gewisse Zeit benötigt, um den größten Hemmgrad zu erreichen.

In der Mehrzahl der Fälle ist in einem angemessenen pH-Bereich der Hemmgrad eine lineare Funktion der Inaktivator-konzentration und hängt nicht ab von der Reinheit des verwendeten Präparates (Ausnahme: Inaktivator aus Ascaris). Interessant war die Entdeckung, daß die Trypsin-Inhibitoren für Trypsin nicht spezifisch sind. Die meisten von ihnen hemmen auch Chymotrypsin. (Molekulargewicht = 22 500 (29, 30)). Auch Plasmin und damit die Fibrinolyse werden von manchen Inhibitoren gehemmt (31 - 35). Die Blutgerinnung selbst wird jedoch nicht blockiert (36 - 44).

Die physiologische Bedeutung von Trypsin-Inaktivatoren zeigt sich besonders anschaulich im Falle des Hemmstoffes aus Ascaris, durch den sich der Ascaris im Darm des Wirtes vor tryptischer Verdauung schützt. In vielen anderen Fällen ist das Vorhandensein von Trypsin-Inaktivatoren bisher nur Gegenstand von Spekulationen.

Einzelheiten der bekannten Inhibitoren sollen nun bei ihrer kurzen Charakterisierung besprochen werden:

III. Bisher bekannte Inaktivatoren.

a.) Pflanzliche Inaktivatoren.

Schon seit längerem ist bekannt, daß in vielen Pflanzen Trypsin-Inaktivatoren vorkommen, eine überraschende Tatsache, für die bis heute eine plausible Erklärung nicht gefunden wurde. MANSFELD (45) nimmt an, daß pflanzliche Inhibitoren

ganz allgemein durch Hemmung der Autolyse eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Lebensform spielen. Auffallend ist, daß Trypsin-Inaktivatoren besonders bei den Pflanzen gefunden wurden, die in Symbiose mit Bakterien leben, (z.B. den bekannten Knöllchenbakterien bei allen Leguminosen) oder die in einer reichen Bakterienflora leben (46).

Eine umfassende Übersicht über die bisher bekannten pflanzlichen Trypsin-Inhibitoren findet sich bei LASKOWSKI (11) und VOGEL (12).

Ganz im Vordergrund steht die große Gruppe der Inaktivatoren in

Leguminosen (25, 47).

Am besten untersucht ist der Inaktivator aus

1.) Sojabohnen (SBI).

Die trypsinhemmende Wirkung von Sojabohnen wurde 1944 von HAM und SANDSTEDT (48) und BOWMAN (49) entdeckt. Sojabohnen enthalten fünf verschiedene aktive Inaktivator-Proteine (50), von denen jedoch bis 1955 nur ein Inaktivator (SBI) isoliert und genau beschrieben wurde (15, 51, 52).

Der im Handel befindliche Inaktivator ist oft unrein. Er läßt sich in vier verschiedene aktive Fraktionen zerlegen, von denen wenigstens zwei homogen sind (53 - 55).

Der Sojabohnen-Inaktivator ist relativ säure- und hitzelabil; bei 30°C wird er irreversibel denaturiert. Er wurde kristallin erhalten (21), hat ein Molekulargewicht von 18 000 (14, 56) bis 20 000 (57) und einen IEP von 4,5 (15).

Er enthält als einziger der bekannten Inaktivatoren Tryptophan.

Außer Trypsin hemmt er: Chymotrypsin (35), Plasmin (58), Serunkallikrein (59 - 62), Proteinase A und A₁ aus Rattenhaut (63) und die fibrinolytische Aktivität von Streptokokken (35). Außerdem wirkt SBI entzündungshemmend (64). Nicht gehemmt werden: Esterase (65), Carboxypeptidase (66), Pepsin und Papain (67), Pankreas-, Submaxillaris- und Harn-Kallikrein (68, 69).

Durch Verfütterung von Sojabohnen kommt es bei den Versuchstieren zu einer Wachstumshemmung (11, 70 - 72, 74 - 77, 79), obwohl SBI in vitro durch Pepsin verdaut wird.

Da aber die Verdauung durch Pepsin längere Zeit in Anspruch nimmt, (in 45 Minuten werden 50% des Inaktivators zerstört), ist es denkbar, daß der SBI bei der Magenpassage nicht quantitativ verdaut wird und im Darm eine Trypsinhemmung bewirkt, wodurch es zu einer Eiweißverwertungsstörung kommen kann.

Im Gegensatz zu Kunitz, der im Tierexperiment nach iv.-Gaben von SBI eine Gerinselbildung beobachtete, kommt es nach HLADOVEC (78) et al. zu einer Gerinnungshemmung.

Bis zu einem gewissen Grade sollen Thrombin und Thromboplastin gehemmt werden (73, 80).

2.) Lima-Bohne.

Der besonders hitzestabile Inaktivator (47) konnte kristallin erhalten werden (81, 82). Die Aminosäurezusammensetzung ist bekannt (17). Die Lima-Bohne enthält vier homogene Inaktivator-Proteine, die gegen peptische Verdauung und gegen Säure stabil sind (83, 84). Das Molekulargewicht

beträgt 10 000. Außer Trypsin wird Proteinase A und A₁ aus Rattenhaut gehemmt (63).

3.) Alfalfa (=Luzerne).

Der Alfalfa-Inhibitor ist durch Alkohol fällbar, nicht dialysabel und relativ hitzestabil. Elektrophoretisch ist er heterogen (86,85).

Nach Verfütterung wurde an Kühen eine Wachstumsverzögerung beobachtet (53, 85), er wird daher wohl nicht oder nur langsam von Pepsin verdaut.

4.) Erdnuß.

Der Inaktivator aus Erdnüssen wurde von ASTRUP (87, 88) isoliert. Er vermag die Fibrinolyse stark zu hemmen. Bei Gesunden führt der Genuß von Erdnüssen zur Abnahme der spontanen fibrinolytischen Aktivität des Serums (88). Im Blut des Serums wurde dabei eine Zunahme des die Fibrinolyse hemmenden Inaktivators beobachtet (89).

5.) Bohnen, Erbsen, Linsen (12).

Der Trypsin-Inaktivator aus Bohnen, Erbsen und Linsen hemmt auch Chymotrypsin. Er wirkt antiphlogistisch (45) und wachstumshemmend. Bei Verfütterung an Hühner geht die Eiproduktion zurück (90).

In Stangenbohnen und Gartenerbsen findet sich außerdem ein Papain-Inaktivator (91).

Nicht-Leguminosen.

In Nicht-Leguminosen sind bisher erst wenige Trypsin-Inaktivatoren gefunden worden. Einen bisher unbekannten Inaktivator entdeckten wir in Runkelrüben, dessen Anreicherung und Charakterisierung im Versuchsteil beschrieben wird.

Bekannt ist das Vorhandensein eines Trypsin-Inaktivators in

Getreide (92, 93) und

Kartoffeln (94, 95).

In Kartoffelknollen findet sich ein thermolabiler Trypsin-Inaktivator, der neben Trypsin auch Kallikreine (96 - 98) und Chymotrypsin (99, 100), Kathepsin, Pepsin (96), Fibrinolyse (59, 101) und Elastase (102) hemmt. Er hat einen entzündungshemmenden Effekt (101, 103). Beim Lagern der Kartoffeln nimmt der Inaktivatorgehalt ab. Der Inaktivator findet sich nur in den Knollen, nicht in Blättern, Wurzeln und Stengeln (97).

Nicht vorhanden ist der Inaktivator nach WERLE et al. (98) in: Tomate, Paprika, Tabak, Mohrrübe, Runkelrübe, Farnkraut, Schachtelhalm, Birne, Apfel.

b) Tierische Inaktivatoren.

Eine große Zahl von Trypsin-Inaktivatoren ist in tierischem Gewebe gefunden worden. Wie bei den pflanzlichen Inhibitoren zeigte sich auch hier eine Artspezifität.

Die physiologische Bedeutung der meisten Inhibitoren ist wie bei denen der Pflanzen nicht bekannt. Daß sie aber sicherlich eine wichtige Rolle spielen, ist eklatant, wenn man an die therapeutischen Erfolge denkt, die z.B. mit Trasylol, einem Rinder-Parotis-Inaktivator erzielt werden konnten.

Ein besonders anschauliches Modell für die physiologische Bedeutung von Trypsin-Inaktivatoren bietet der

1. Ascaris.

der sich vor der Verdauung durch die Proteasen des Wirtsorganismus durch einen Trypsin-Inaktivator schützt, der außer Trypsin (104) noch Pepsin (105) und Kallikreine hemmt, nicht aber Esterase (65) und die pflanzlichen Proteinasen Papain (105) und Ficin. Die Cortex der Spulwürmer wird durch Papain und Ficin verdaut. Diese Tatsache hat man sich in der Praxis zu Nutze gemacht und gibt Papain und Ficin als Wurmmittel.

Die Reinigung ergab ein amorphes Präparat (106), das nicht mit TES fällbar ist und langsam dialysiert (65). Die Hemmung von Trypsin soll im Gegensatz zu den meisten anderen Inhibitoren nicht stöchiometrisch sein (11, 106).

Neben dem Trypsin-Inaktivator wurde ein weiterer für Chymotrypsin gefunden, der sich durch heiße 2,5%ige TES abtrennen läßt (65). Dieser Chymotrypsin-Inaktivator ist streng spezifisch und elektrophoretisch einheitlich (107).

2. Rinder-Parotis-Inaktivator (=Trasylol).

Die erste Arbeit über den Rinder-Parotis-Inhibitor (109) stammt von KRAUT, FREY und WERLE aus dem Jahre 1930. Die Isolierung gelang KRAUT (108 - 112) und WERLE u. TRAUTSCHOLD (unveröffentlicht). Der Inaktivator ist in der Ultrazentrifuge und elektrophoretisch einheitlich (112, 113). Er ist säure- und hitzestabil, mit TES nicht fällbar (109) und langsam dialysabel (68). Trasylol ist ein basisches Polypeptid, das kein Tryptophan und Histidin enthält (112). Sein Molekulargewicht beträgt nach unseren Bestimmungen (Fritz (114), Werle und Trautschold) etwa 6500 und liegt damit weit unter dem von Kraut angegebenen Wert von 11 600.

Außer Trypsin werden auch Kallikreine (Pankreas-, Submaxillaris- und Harnkallikrein (115)) gehemmt. Bei Verwendung des natürlichen Substrats Kallidinogen wird dabei die Kallidinfreisetzung verhindert (99, 115 - 118). Weiterhin hemmt Trasylol auch Chymotrypsin (99), Elastase (119), Collagenase ((120) und eigene Untersuchungen, im Gegensatz zu (121)) und Plasmin (122).

Es wird weder von Pepsin noch von Trypsin abgebaut (123, 124). Es hemmt weder Pepsin (123) noch Kathepsin (124), Papain (123), Diastase und Lipase (126), Schimmelpilzproteinasen (99), Carboxypeptidase und Leucinaminopeptidase (124 u. WERLE-TRAUTSCHOLD (unveröffentlicht)), Ficin und Amylase (111).

Die Rinder-Parotis enthält pro g Gewebe 400 KIE (127), bzw. 300 - 400 TIE. Eine Identität mit dem Rinder-Pankreas-Trypsin-Inaktivator (Kunitz-Inaktivator) wird diskutiert (112, 128).

Viele Isolierungs-Patente sind angemeldet. Großtechnisch wird der Inhibitor unter dem Namen Trasylol von der Firma Bayer hergestellt. Das Vorkommen eines Parotis-Inhibitors scheint für das Rind spezifisch zu sein. Zwar findet er sich in sehr geringer Konzentration auch bei Schaf und Hirsch, jedoch ist er sonst bei keiner Spezies vertreten, auch nicht beim Menschen (127).

Die Erfolge, die mit Trasylol bei der Therapie der akuten Pankreatitis erzielt werden konnten, haben deutlich gemacht, daß die Trypsin-Inaktivatoren nicht nur von theoretischem Interesse sind.

In weiteren Rinderorganen wurden ebenfalls Trypsin-Inaktivatoren gefunden, z.B. in der

3. Rinder-L u n g e.

Der Inhibitor ist ein basisches Polypeptid. Das angegebene Molekulargewicht von $12\ 000 \pm 300$ stimmt sicher nicht, da nur ein teilgereinigtes Präparat geprüft wurde (129, 130).

Der Inaktivator ist säure- und hitzestabil und schwach dialysabel. Außer Trypsin hemmt er auch Kallikrein (68, 127, 131), Plasmin, Elastase (121) und schwach Chymotrypsin (132 - 134).

Beim Trypsin wird die esterolytische Aktivität stärker gehemmt als die proteolytische. Das gilt nach WERLE (68) wohl für alle Inaktivatoren.

1 g Lunge enthält 1000 KIE bzw. 2500 TIE.

Der Inaktivator hat sehr große Ähnlichkeit mit dem Parotis-Inhibitor, scheint sogar mit Trasylol identisch zu sein (111), da das Hemmspektrum gleich ist, das Molekulargewicht, Elementanalyse, Bausteinanalyse, Wanderung im elektrischen Feld, UV-Absorption und Kristallform des freien Inaktivators und des Inaktivator-Trypsin-Komplexes.

Ein Inhibitor mit den gleichen Eigenschaften kommt in der

4. Rinder-Leber

vor (127). Auch dieser Inhibitor ist säure- und hitzestabil (135, 136), nicht mit TES fällbar, wird nicht von Pepsin und Trypsin abgebaut und hemmt außer Trypsin auch Kallikrein, Chymotrypsin und Fibrinolysin. Ein Isolierungsverfahren wurde beschrieben (136). Das isolierte Präparat ist papierchromatographisch und elektrophoretisch einheitlich. Verschiedene Patente zur großtechnischen Herstellung sind ange-

meldet.

Der von WERLE et al. (156) gefundene Trypsin-Kallikrein-Inaktivator in

5. Lymphdrüsen und Milz (Rind)

hat die gleichen Eigenschaften wie die Inaktivatoren aus Rinderparotis, Rinderlungen und Rinderleber. Es ist überraschend, daß in verschiedenen Rinderorganen offensichtlich der gleiche, bzw. sehr ähnliche Inaktivatoren vorkommen, (dazu zählt auch der von Kunitz beschriebene Rinder-Pankreas-Inaktivator, der im Zusammenhang mit anderen Pankreas-Inhibitoren beschrieben werden soll) und daß außerdem diese Inaktivatoren bei keiner anderen Spezies vorzukommen scheinen. Ob das Rind als Wiederkäuer, das in seinem Darmtrakt besonders viele Bakterien beherbergt, einen besonderen Schutz gegen Bakterien-Proteinasen braucht, kann im Augenblick nur Spekulation sein.

Ein anschauliches Beispiel für die Artspezifität der Trypsin-Inaktivatoren bietet der Hemmstoff aus Vogelei-Eiweiß. In Eiern verschiedener Vogelspezies wurden verschiedene Inaktivatoren gefunden. Der Faktor, der die Proteinase-Hemmwirkung verursacht, ist ein Muco-Protein, das

6. O v o m u c o i d.

Daß frisches Eiweiß Trypsin zu hemmen vermag, weiß man schon seit 1903 (137). Daß aber der Hemmstoff nicht eine "Antikinese" sondern ein "Antitrypsin" ist, erkannte man erst später (138). Der Inaktivator wurde gereinigt, seine Eigenschaften und Stabilität wurden eingehend untersucht (27, 70, 139 - 142). Die Aminosäurezusammensetzung ist

bekannt. Daneben enthält Ovomuroid einen KH-Anteil von 20% (143, 144).

Der aus Hühnereiweiß isolierte Inaktivator (145) konnte nicht kristallin erhalten werden. Das amorphe Präparat ist elektrophoretisch heterogen, im sauren Bereich beständig, im alkalischen wird es denaturiert. Außer Trypsin werden auch Chymotrypsin (146, 147), Blutplasma-Kallikrein (148) und Aspergillus-Protease gehemmt, nicht aber andere Kallikreine (201) oder Plasmin (62). Von Pepsin wird der Inaktivator verdaut. Wie der Kazal'sche Inaktivator wird das Ovomuroid von Trypsin abgebaut.

Im Eiklar ist nach WERLE (148) ein weiterer Inhibitor für Kallikrein vorhanden, der thermolabil, säurestabil und nicht dialysabel ist. Diese Substanz hemmt nur Menschenkallikrein.

Die Streitfrage, ob Ovomuroid auch Chymotrypsin hemmt (146, 147) oder nicht (149) konnte mit der Artspezifität der Inaktivatoren aus verschiedenen Vogeleiern geklärt werden (150, 151, 152). Einen spezifischen Trypsin-Inaktivator findet man im Eiklar von Huhn, Gans, Wachtel und Kasuar, einen spezifischen Inaktivator für Chymotrypsin im Eiklar des Goldfasans, einen Inaktivator, der gleichermaßen Trypsin und Chymotrypsin hemmt beim Truthahn, schließlich einen Inhibitor, dessen Einzelmolekül gleichzeitig zwei Moleküle Trypsin und ein Molekül Chymotrypsin zu hemmen vermag, im Eiklar von Ente, Emu und kalifornischer Wachtel.

Die physiologische Bedeutung dieser Inhibitoren ist unbekannt. Diskutiert wird ein Schutz vor Selbstverdauung beim Bebrüten.

Ein weiterer Trypsin-Inaktivator wurde in

7. Rattenhaut

beschrieben. Er ist säure- und hitzestabil und nicht dialysabel (153). Er hat die gleichen Eigenschaften wie der in

8. Kaninchenhaut

gefundene Hemmstoff.

Im Blut der

9. Weinbergschnecke

haben WERLE et al. zwei Trypsin-Inaktivatoren und einen davon verschiedenen Kallikrein-Inaktivator gefunden (157).

Besonders gut untersucht ist der Inhibitor aus Rinder- und Menschen-Colostrum.

10. Colostrum.

Er wurde 1950 entdeckt (158) und kurz darauf in seinen Eigenschaften aufgeklärt und kristallisiert (22, 159, 160). Der Hemmstoff ist ein saures Polypeptid mit einem IEP von 4,2 (159). Er hat ein Molekulargewicht von 10 500 (160) und enthält kein Tryptophan. Das UV-Absorptionsspektrum zeigt eine für Proteine typische Kurve (161).

Außer Trypsin wird auch Chymotrypsin und Kallikrein gehemmt (146).

Eine genaue Übersicht findet sich bei (11, 12, 27, 70, 142).

Beim Menschen, Rind und Schwein verschwindet der Colostrum-Inaktivator am 5. Tag post partum (159, . 161).

Da der Inaktivator gleichzeitig mit den Immunoglobulinen auftritt, wird angenommen, daß er bei der Übertragung der

Immunoglobuline eine Rolle spielt, indem er die Antikörper vor tryptischer Verdauung schützt (159).

Schon seit 1900 ist die trypsinhemmende Wirkung von

11. Blutplasma

bekannt. LANNOY (162) fand den Inhibitor im Blutplasma von Mensch, Pferd, Nagetieren, Kühen und Aalen. Ein Isolierungsverfahren ist beschrieben (163, 204).

Der thermolabile, nicht dialysierbare Inaktivator (164) ist in Säure instabil, wird aber nicht durch TES gefällt.

Elektrophoretisch ist er heterogen. Der größte Teil (90%) wandert bei der Elektrophorese mit der α_1 -Globulin-Fraktion, 10% mit der α_2 -Globulin-Fraktion. Es handelt sich dabei nicht um zwei aktive Fraktionen eines Inaktivators, sondern um zwei von einander unterscheidbare Inhibitoren. Der mit der α_1 -Fraktion wandernde Inaktivator hemmt neben Trypsin auch Chymotrypsin, der mit der α_2 -Fraktion wandernde noch zusätzlich Plasmin (166 - 170). Der Plasmin-Inaktivator konnte ebenfalls rein dargestellt werden (171).

Normalerweise werden pro ml Serum 1250 ± 100 μ g Trypsin gehemmt (172). Der Hemmstoff wird in den Harn ausgeschieden. Dort findet man zwei Inhibitoren, von denen möglicherweise einer der Blutplasma-Inaktivator ist (173).

Nach chirurgischen Eingriffen und bei verschiedenen Krankheiten steigt der Hemmstoffgehalt des Blutes an (Pankreatitis, Diabetes mellitus, Hepatitis, Lebercirrhose, Verschlußikterus und Ca). Bei der akuten Pankreatitis findet man eine Zunahme der α_1 -Fraktion, dagegen verschwindet die α_2 -Fraktion völlig (174).

12. Harn.

Es wird angenommen, daß der Trypsin-Inaktivator, der im Harn gefunden wird, aus dem Blut stammt (176, 177), jedoch fand FUJIMOTO, daß der Inhibitor in menschlichem Harn hitzebeständiger ist als der im Blutplasma. Erst durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 100°C wird er zerstört (164, 178). Ein Trypsin-Plasmin-Inaktivator wird bei der Reinigung (173, 179, 180) zerstört (130, 179).

Das gereinigte Präparat ist elektrophoretisch homogen. Der Harn-Inhibitor ist ein extrem saures Polypeptid mit einem IEP von 2,1 (181). Er ist säurestabil und hat ein Molekulargewicht von 30 000. Außer Trypsin hemmt er schwach Chymotrypsin und Hyaluronidase (182), nicht aber Aspergillus-Protease und Kallikrein. (Es wird ja von allen Spezies aktives Kallikrein im Harn ausgeschieden (183)).

Ohne Aktivitätsverlust konnte ASTRUP von diesem Inhibitor Sialinsäure abtrennen (184).

Der parallele Verlauf von Inaktivator und 17-Keto-Steroid-Ausscheidung im Harn läßt auf eine Regulation durch das Hypophysen-Nebennierenrinden-System schließen (22, 185, 186). Postoperativ, bei Fieber und Stress, nach Gaben von ACTH und Corticosteroiden steigt die Inaktivator-Ausscheidung an (176, 187). Auch in der Schwangerschaft steigt die Ausscheidung signifikant an (188). Der Tagesrhythmus der Ausscheidung stimmt mit dem der 17-Keto-Steroide überein (187). Erhöhte Werte findet man auch bei schweren Erkrankungen, z.B. bei Tuberkulose, chronischen Nierenerkrankungen und Carcinomen (188, 189). Der Befund, daß auch bei chronischen Nierenerkrankungen vermehrt Inaktivator im Harn gefunden

wird, spricht für eine erhöhte Durchlässigkeit des Blut-plasma-Inaktivators, ein weiterer Anhaltspunkt dafür, daß der Harn-Inhibitor tatsächlich aus dem Blut stammt.

13. Submandibularis-Drüsen (Hund).

1963 berichteten TRAUTSCHOLD et al. über einen Trypsin-Inaktivator in Submandibularis-Drüsen von Hund und Katze (STI) (61). Pro g Gewebe finden sich beim Hund 20 000 - 60 000 TIE. Das ist der bisher höchste Gehalt eines Organs an Inhibitor. Der Inaktivator wird in den Speichel sezerniert. Der nach Injektion von Pilokarpin gewonnene Speichel enthält in den ersten 10 Minuten durchschnittlich 3000 TIE pro ml, nach 60 Minuten Sekretion nur mehr 1600 TIE. Ein Isolierungsverfahren findet sich bei TRAUTSCHOLD, WERLE et al. (190).

Der Inhibitor hemmt außer Trypsin auch Chymotrypsin, nicht aber Kallikrein, wodurch er sich von allen anderen bis dahin bekannten Organ-Inhibitoren unterscheidet.

Der Inaktivator ist säure- und hitzestabil, wird im Alkalischen zerstört und ist dialysierbar.

Er ist ein basisches Polypeptid mit einem Wirkungsoptimum $pH = 6 - 8$. Er wird von Pepsin abgebaut, verliert also im tierischen Magen seine Wirksamkeit.

Das Vorkommen des Inaktivators beschränkt sich auf die Gruppe der Kaniden und in geringem Maße der Feliden. Seine physiologische Bedeutung ist unbekannt. Diskutiert wird ein Schutz gegen die bakteriellen Proteinase des Speichels.

Im Weiteren soll die Gruppe der Inaktivatoren aus Pankreas beschrieben werden, die uns im Hinblick auf die Pankreatitis (Schutz vor tryptischer Selbstverdauung)

besonders interessiert.

Der erste Pankreas-Inaktivator, der genauer untersucht und beschrieben wurde, ist der aus

14. Rinder-Pankreas I. (Kunitz),

der 1936 von KUNITZ und NORTHROP isoliert wurde (191).

Sie fällten nach Entfernen des Trypsinogens die Extrakte aus Rinder-Pankreas mehrere Male mit abgestuften Konzentrationen von $MgSO_4$ und zerstörten Begleitprotein durch Erhitzen auf $80^{\circ}C$.

Die Ausbeute war bei dieser Methode nicht sehr groß.

Eine größere Ausbeute erhielten GREEN und WORK (16), die den Inaktivator aus den Rückständen bei der Insulin-Gewinnung isolierten. Eine weitere chromatographische Reinigung beschrieben SCEVOLA et al. (193, 194). Sie erhielten damit einen 200%igen Aktivitätszuwachs.

KASELL und LASKOWSKI publizierten ein modernes Reinigungsverfahren (195, 196). Nach der Vorreinigung (191) wird der Trypsin-Inaktivator-Komplex hergestellt. Nach Chromatographie an Dowex 1-X2 wird der Komplex durch Dialyse gegen 0,02n HCl (pH = 1,7) gespalten und an Sephadex G 50 getrennt. Der Inaktivator wird anschließend an Amberlite zweimal chromatographiert. Nach Entsalzen ist er in der Ultrazentrifuge einheitlich.

Der Kunitz'sche Inaktivator ist ein basisches Polypeptid mit einem IEP von 10 (16) und einem Molekulargewicht von 6500 (191). Der Proteinfaktor beträgt 1,26 (160), 1 μg Inhibitor hemmt 3,7 μg Trypsin (14).

Die Aminosäurezusammensetzung ist bekannt (196). Der Inhibitor enthält kein Tryptophan und Histidin. Er ist säure-

und hitzestabil und wird durch 5 - 10%ige TES nicht gefällt (70). Er ist langsam dialysabel. Im Alkalischen wird er langsam zerstört. Bei pH = 12 verliert der Inaktivator in 24 Stunden 50% seiner Aktivität. In Form eines Trockenpulvers ist er über Jahre haltbar.

Außer Trypsin hemmt er Chymotrypsin (165), Plasmin, die fibrinolytische Aktivität von Streptokokken (35), ferner Elastase (197 - 199) und Kallikrein (200).

Entgegen früherer Untersuchungen mit nicht definierten Präparaten (115, 201) wird also auch Kallikrein durch diesen Inhibitor gehemmt.

Der Inhibitor wirkt entzündungshemmend. Sein besonderes Charakteristikum ist seine Stabilität gegen peptische Verdauung (202). Dadurch unterscheidet er sich von allen bisher bekannten Inaktivatoren.

Er ist unter dem Namen "Iniprol" im Handel.

Nach den Untersuchungen von KRAUT und WERLE (112) ist der Kallikrein-Inaktivator aus Rinderorganen mit dem Inaktivator von Kunitz identisch.

15. Rinder-Pankreas II. (Kazal).

Ebenfalls aus Rinder-Pankreas isolierte Kazal (203) einen Trypsin-Inaktivator, der im Gegensatz zum Kunitz-Inaktivator Chymotrypsin nicht hemmt.

Der Inhibitor wurde bei der Insulingewinnung aus dem Überstand gewonnen, der nach Aussalzung des Insulins übrigbleibt. Die Steigerung der NaCl-Konzentration von 15% auf 31% führt zur Ausfällung des Inhibitors. Er wird mit Alkohol umgefällt und zur Abtrennung von Begleitprotein in 2,5%iger TES 5 Minuten auf 80°C erhitzt. Aus dem TES-Filtrat kristal-

lisierte der Inaktivator in langen Nadeln aus.

Um genügend Ausgangsmaterial für seine Charakterisierung zu haben, mußten mehrere Tonnen Pankreas extrahiert werden. (Kazal selbst gibt an, daß er zu einer Präparation 816,5 kg Pankreas benötigte) .

Sehr wenige Laboratorien haben die Möglichkeit, so große Mengen aufzuarbeiten. Deshalb ist der Kazal'sche Inaktivator nie von einem zweiten Autor isoliert worden. Alle, die mit diesem Inaktivator gearbeitet haben, haben ihn direkt von kazal bezogen.

Die Ausbeute beim angewandten Isolierungsverfahren war äußerst gering. Nur 75 µg Inaktivator wurden pro kg Pankreas erhalten.

Das kristalline Präparat ist säurestabil und hat ein Molekulargewicht von 9600 (160). Elektrophoretisch ist der dreimal rekristallisierte Inaktivator heterogen. Eine Komponente wandert zur Kathode, zwei wandern zur Anode (203). Diese Feststellung stimmt nicht mit den für die drei Zonen angegebenen isoelektrischen Punkte überein, für die Werte von 4,8 ; 5,2 ; und 5,9 gefunden wurden. Wenigstens zwei der Komponenten sind aktiv.

In trockener Form ist der Inaktivator einige Jahre stabil. Er hemmt Trypsin (1 µg hemmt 2,57 µg Trypsin (160)) und Plasmin (165), nicht aber Chymotrypsin (146). Eine Kallikreinhemmung ist nicht untersucht worden.

Der Inaktivator ist nicht dialysabel (204) und wird durch 5 - 10%ige TES gefällt (70).

Interessanterweise wird er durch Chymotrypsin und durch Trypsin zerstört (11), ein Phänomen, das "temporary inhibition" genannt wurde (siehe dort).

Von Pepsin wird der Kazal'sche Inaktivator schnell verdaut. Schon in 5 Minuten verlieren 50% des eingesetzten Inaktivators ihre Aktivität (202).

Der Proteinfaktor beträgt für das Kazal'sche Präparat 1,54.

Wie in der Bauchspeicheldrüse vom Rind kommen Trypsin-Inaktivatoren in den Pankreata aller bisher untersuchten Tierarten und beim Menschen vor. So ist auch bekannt, daß im

16. Hunde-Pankreas

ein Inhibitor vorkommt. GROSSMAN, der ein Pankreas-Homogenat mit TES enteweißte und lyophilisierte (205), fand, daß pro g Pankreas 102 µg Trypsin gehemmt werden und daß der Inaktivator wie der Kazal'sche von Trypsin und Chymotrypsin zerstört wird (bei pH = 7,5 und 37°C in 2 Stunden zu 100%). Nach (5) enthält das Hundepankreas einen Trypsin-Inaktivator, der in sehr geringem Maße auch Kallikrein zu hemmen vermag. Nach Enteiweißen des Homogenats fände sich nurmehr eine Inhibitor-Kapazität von 20% der ursprünglichen. Die überwiegende Hemmkapazität stamme also von einem hochmolekularen Inaktivator.

Auch nach (61) werden im Hundepankreas wenigstens zwei trypsininaktivierende Prinzipien unterschieden:

- 1.) der als "freier" Inaktivator bezeichnete von 800 KIE/g Gewebe (keiner Hemmung von 1,2 mg Trypsin zu 50%)
- 2.) der säurestabile Inaktivator, der Trypsin und Kallikrein zu hemmen vermag (80 KIE/g Gewebe).

Es war unsere Hauptaufgabe, den Hunde-Pankreas-Inaktivator genauer zu untersuchen und zu charakterisieren.

Im menschlichen Pankreas-Homogenat findet sich ein säure-stabiler, niedermolekularer Inhibitor, der Kallikrein nicht hemmt (5).

Es ist von Interesse, inwieweit die Pankreas-Inaktivatoren in den Saft sezerniert werden.

KALSER und GROSSMAN (206) befaßten sich 1955 zum ersten Mal mit der Untersuchung von Pankreassekreten. Sie fanden bei der experimentellen Stimulierung des Pankreas nur eine begrenzte Inaktivator-Ausschüttung im Vergleich zu der maximal aktivierbaren Trypsinogenmenge im sezernierten Saft. Nach WERLE et al. (5) können in dem durch Sekretin und Pankreozymin-Reiz gewonnenen Sekret von Rind, Hund und Schwein etwa 10% des maximal aktivierbaren Trypsinogens gehemmt werden. Das gleiche Verhältnis fände sich im Pankreas-Homogenat. Der Inhibitor des menschlichen Pankreas-Sekretes vermag nach HAVERBACK (1) etwa 30% des im Saft enthaltenen Trypsinogens nach dessen Aktivierung zu hemmen. Im Saft von Schwein, Hund und Rind wurde von WERLE et al. (5) ein niedermolekularer Inhibitor für Trypsin gefunden, der nicht Kallikrein hemmt, also vom Kunitz'schen Inaktivator verschieden ist.

Im Rattenpankreas-Saft fand GROSSMAN einen TES-löslichen Inaktivator, der Chymotrypsin nicht hemmt (205, 207).

Dieser Inaktivator wird - wie der von Kazal - von Trypsin und Chymotrypsin zerstört.

Im menschlichen Sekret hat HAVERBACK (1) einen Inhibitor beschrieben, der TES-löslich und säurestabil ist. Pro ml Saft werden durchschnittlich 100 µg Trypsin gehemmt.

Der Inaktivator wird von Trypsin und Chymotrypsin nicht abgebaut. HAVERBACK diskutiert die Diskrepanz mit dem

Grossman'schen Inaktivator entweder als Spezifität der Spezies oder als Ergebnis verschiedener Extraktionsverfahren.

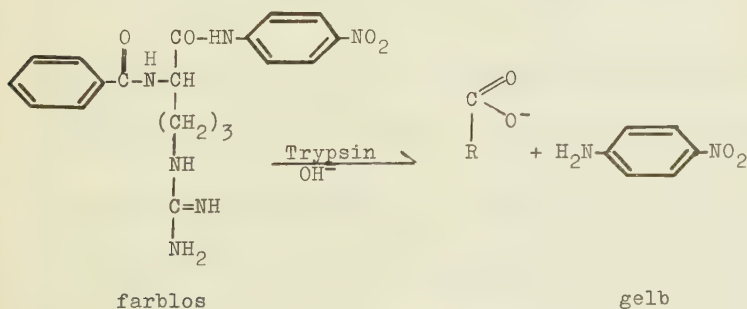
Im Kaninchen-Pankreas-Saft fand KALSER (208) einen Trypsin- Inaktivator, der in 2,5%iger TES löslich und dialysierbar ist.

C. experimenteller Teil.

1. Beschreibung der BAPA- Methode zur Bestimmung der Trypsin- Aktivität.

Zu Beginn der Darstellung unserer eigenen Untersuchungen soll die BAPA- Methode beschrieben werden, mit welcher wir fast alle unsere Messungen durchgeführt haben.

BAPA (N^{α} -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilid-Hydrochlorid) ist ein farbloses synthetisches Substrat für Trypsin (209) (oder Papain). Bei seiner Spaltung wird jedoch eine farbige Komponente frei, das p-Nitroanilin, dessen Zunahme bei einer bestimmten Wellenlänge direkt photometrisch verfolgt werden kann.



Die Geschwindigkeit der Zunahme des farbigen Spaltproduktes (gemessen als Extinktionszunahme/Minute) ist ein Maß für die Aktivität und damit die Menge des eingesetzten Trypsins. Die Methode ist sehr genau und erlaubt, sogar Bruchteile von einem μg Trypsin nachzuweisen. Weiß man, welche Spaltung und damit Extinktionsänderung eine bestimmte Menge Trypsin pro Zeiteinheit verursacht, so kann man nach Zugabe von Inaktivator aus der Abnahme der Extinktionsänderung in der Zeiteinheit indirekt die Menge des zugesetzten Inaktivators bestimmen. Es wird gerade soviel Inaktivator hinzugefügt, daß ungefähr eine 50%ige Hemmung resultiert.

Wir benutzten zu unseren Messungen das Photometer nach Eppendorf bei einer Wellenlänge von 405 m μ und Glasküvetten mit einem Durchmesser von 1 cm. Das Endvolumen in den Küvetten betrug jeweils 3 ml.

Die verwendete Substrat-Stammlösung, die bei Raumtemperatur mehrere Tage haltbar ist, enthielt pro ml 1 mg BAPA. Zu ihrer Herstellung wurden 100 mg BAPA in 100 ml aqua bidest. in der Wärme gelöst.

Als Standard-Trypsin verwendeten wir ein dreimal rekristallisiertes Präparat der Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey.

Wir lösten 10 mg Trypsin in 100 ml einer 0,0025 n HCl und verwahrten diese Enzym-Stammlösung für die Dauer der Versuche im Eisbad, um eine Selbstverdauung des Trypsins zu verhindern. Die Trypsin-Stammlösung wurde täglich neu angesetzt.

Bei den Einzelmessungen wurden pro Ansatz 5 - 10 μg Trypsin (0,05 - 0,1 ml) eingesetzt, jeweils 1 mg BAPA (1 ml) und

soviel TRAP-Puffer (Triäthanolamin-Hydrochlorid) (0,2M, pH = 7,8), daß das Küvettenendvolumen immer 3 ml ausmachte. Gestartet wurde die Reaktion jeweils mit der Zugabe des Substrates, nachdem wir Puffer, Trypsin und Inaktivator in der Küvette im Wasserbad bei 25 bzw. 37°C 5 Minuten lang inkubiert hatten.

Die Spaltung verlief bei den verwendeten Mengenverhältnissen während 25 Minuten linear.

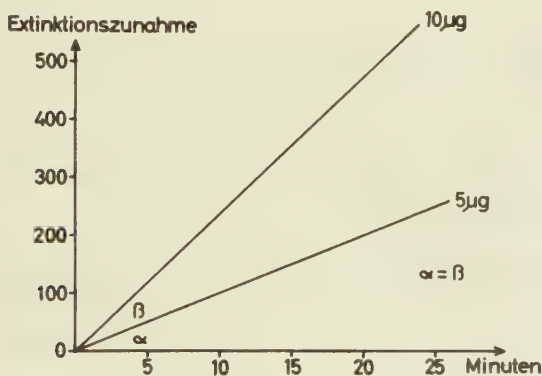


Abb. - 2 -

Verlauf der BAPA-Spaltung bei Einsetzen von 5 und 10 µg Trypsin. Näheres siehe Text.

Gemessen wurde die durch die Spaltung bewirkte Extinktionszunahme innerhalb 10 Minuten.

Da wir uns bei der Bestimmung der Inaktivator-Menge nur indirekt am Geringerwerden der BAPA-Spaltung, d.h. an der Abnahme der Extinktionsänderung orientieren, also keine Gewichtseinheiten angeben können, nehmen wir die Trypsin-hemmung als Maßstab. Wir bezeichnen die Menge Inaktivator als 1 Trypsin-Inaktivator-Einheit (=1 TIE), die die Aktivi-

tät von 1 μ g Trypsin zu 50% zu hemmen vermag.

II. Charakterisierung eines Trypsin-Inaktivators aus Runkelrüben.

Unsere eigenen Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf pflanzliche Trypsin-Inaktivatoren. Wie berichtet sind eine Reihe von Inaktivatoren aus pflanzlichem Material bekannt, so in der großen Gruppe der Leguminosen, in Getreide und in Kartoffeln.

Ausgehend von der Vogel'schen Arbeitshypothese, nach der gerade bei den Pflanzen Inaktivatoren zu finden sind, die mit Bakterien in einer Gemeinschaft leben, untersuchten wir Runkelrüben, die bekanntermaßen mit dem Bakterium *Azotobacter* zusammenleben.

Untersucht wurden rote, gelbe und weiße Runkelrüben und die Zuckerrübe. Wir fanden in allen untersuchten Rübenarten, von verschiedenen Feldern mit unterschiedlicher Bodenbeschaffenheit, einen Trypsin-Inaktivator.

Getestet wurde nach der BAPA-Methode. Auffallend war eine spontane proteolytische Eigenaktivität des Rübenhomogenats, durch welche BAPA gespalten wurde. Besonders stark zeigte sich diese spontane proteolytische Eigenaktivität bei der Zuckerrübe.

Wie schon von WERLE bei der Kartoffel beschrieben zeigte sich auch hier, daß sich ein Rübenhomogenat durch den Luft-sauerstoff schwarz verfärbt, sogar in viel stärkerem Maße als bei der Kartoffel.

Zur Prüfung des Inhibitor-Gehaltes wurde mit einem Star-

Mix-Gerät ein Rübenhomogenat hergestellt, nachdem man pro g Gewebe 1 ml aqua dest. hinzugefügt hatte. Der wäßrige Extrakt wurde scharf abzentrifugiert, der Überstand getestet. Es ergab sich bei der Prüfung verschiedener Pflanzenteile, daß die Inaktivatorkonzentration in den Wurzeln am größten ist, weniger hoch in den grünen Blättern und am geringsten in der Frucht selbst. Setzt man die Inaktivatorkonzentration in den Wurzeln gleich 100%, so ist die Konzentration in den grünen Blättern gleich 21%, die in der Frucht nur 3,5%.

Weiterhin zeigte sich, daß die Inaktivatorkonzentration nicht in allen Runkelrüben die gleiche ist, ja, daß der Inaktivator-Gehalt ganz beträchtlich schwankt. Maximal wurden 680 TIE, minimal 30 TIE pro g Wurzelgewebe gefunden, durchschnittlich 50 TIE pro g Wurzelgewebe.

Für die weiteren Versuche wurde ein Homogenat (wäßriger 1 : 1 - Extrakt) aus Wurzeln von weißen Runkelrüben verwendet.

Es wurde versucht, den Inaktivator mit einer 3%igen TES oder Perchlorsäure von hochmolekularen Begleitstoffen zu befreien. Der Inhibitor befand sich jedoch nicht im Überstand. In schwach alkalischem Medium ließ er sich aber aus dem Niederschlag wieder in Lösung bringen. Diese Tatsache zeigt, daß es sich bei dem Runkelrüben-Inaktivator um einen höhermolekularen Stoff handelt, der säurestabil ist.

Da bei der TES-Fällung sehr viel "schwarzes Material" mit ausgefällt wird, das bei der photometrischen Messung stört, ist diese Methode als Reinigungsschritt nicht gut geeignet.

Erfolgversprechender war ein Aussalzungsversuch mit Ammoniumsulfat. Der Inaktivator befand sich bei einer Sättigung zwischen 45 und 60% im Niederschlag. In leicht alkalischem Milieu ($\text{pH} = 8$) ließ er sich wieder in Lösung bringen. Nach Einengen im Rotationsverdampfer bei 40°C wurde als weiterer Reinigungsschritt eine Gelfiltration an Sephadex G 25 durchgeführt. Hierdurch ließen sich die farbigen Verunreinigungen weitgehend entfernen. Die Ausbeute an Inaktivator betrug 15%. Die Photometer-Aufzeichnung ergab folgendes Bild:

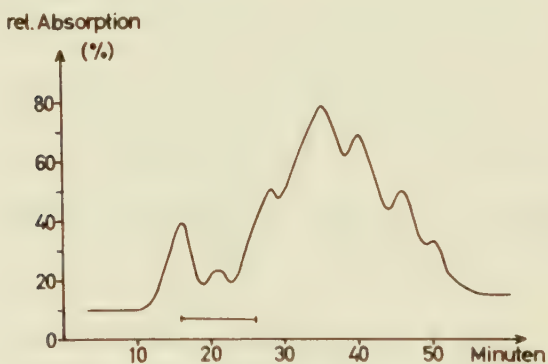


Abb. - 3 -

Protein-Absorptionskurve bei
Sephadex G 25 - Gelfiltration.

Näheres siehe Text. $\longleftrightarrow$ = Inaktivator

Es ließ sich eine 400 fache Anreicherung erzielen. Dieses angereicherte Präparat diente als Ausgangsprodukt für die folgenden Versuche.

Eigenschaften:

In wäßriger Lösung, $\text{pH} = 7$, ist der Inaktivator im Kühlschrank bei 0°C über Wochen stabil. In saurem Medium, $\text{pH} = 3$, läßt sich über Tage ebenfalls keine Abnahme der Aktivität beobachten. In stark saurem Bereich dagegen fällt ein Teil des Inaktivators als Niederschlag aus, bei Zugabe einer 3%igen TES oder HClO_4 sogar quantitativ. In jedem Fall aber kann der Inaktivator in schwach alkalischem Medium wieder in Lösung gebracht werden. Der Inaktivator ist also säurestabil.

In alkalischem Medium, $\text{pH} = 10 - 12$, verliert der Inaktivator langsam an Aktivität. Nach 30 Minuten sind nurmehr 60% aktiv. Durch Ansäuern läßt sich dieser Vorgang nicht rückgängig machen, ist also irreversibel. Der Inhibitor ist also in alkalischem Medium instabil.

Eine Inaktivatorlösung läßt sich ohne Aktivitätsverlust bis auf 50°C erhitzen, wodurch es möglich ist, die Lösung im Rotationsverdampfer einzuengen. Kurzes Erhitzen auf 100°C zerstört den Inaktivator jedoch restlos und irreversibel. Er ist demnach hitzelabil.

Zur Prüfung, ob der Inaktivator von Pepsin abgebaut wird, wurde mit einer sauren Pepsinlösung ($10 \mu\text{g}$ Pepsin/ml, $\text{pH} = 2$) bis zu 30 Minuten inkubiert, danach mit einem 0,2m TRAP-Puffer auf $\text{pH} = 7,8$ eingestellt und wie üblich nach der BAPA-Methode gemessen. Es ergab sich, daß bereits nach 30 Minuten 50% des Inaktivators vom Pepsin verdaut waren.

Zur weiteren Abklärung wurde eine Probe der Inaktivatorlösung in einem Dialysierschlauch gegen fließendes Wasser dialysiert. Nach 18 Stunden Dialyse war keine

deutlich erkennbare Abnahme der Inaktivator-Aktivität zu beobachten. Der Inaktivator war demnach nicht dialysierbar.

Wie bereits erwähnt, werden von 1 g Runkelrüben durchschnittlich 25 μ g Trypsin gehemmt ($\approx$ 50 TIE/g). Es wurde untersucht, ob außer Trypsin noch weitere Enzyme gehemmt werden.

Mit SUPHEPA (N-Succinyl-Phenylalanin-p-Nitroanilid) als Substrat wurde gefunden, daß auch Chymotrypsin gehemmt wird (WOITINAS, Dissertation, München 1965). Die gleiche Menge Inaktivator, die 10 μ g Trypsin zu hemmen vermag, inaktiviert 7,5 μ g Chymotrypsin.

Außerdem wurde mit dem synthetischen Substrat BAEE geprüft, ob der Inaktivator auch Kallikreine hemmt. - Getestet wurden Pankreas-, Harn-, Serum- und Submaxillaris-Kallikrein vom Schwein. Es ergab sich, daß der Inaktivator Pankreas- und Serum-Kallikrein vom Schwein zu hemmen vermag, nicht dagegen Harn- und Submaxillaris-Kallikrein.

Beim Vergleich mit den anderen bisher bekannten Inhibitoren fällt die Ähnlichkeit mit dem Kartoffel-Inaktivator auf, jedoch ist das Kallikrein-Hemmspektrum beim Kartoffel-Inhibitor größer.

Gegen alle anderen Hemmstoffe läßt sich der Runkelrüben-Inaktivator relativ leicht abgrenzen.

Eine Gegenüberstellung von Inhibitoren wird später gegeben, bei der Abgrenzung des Hunde-Pankreas-Inaktivators gegen andere bisher bekannte Hemmstoffe.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß auch in der Zuckerrübe, im Rettich und Radieschen ein Trypsin-Inaktivator vorkommt. Auch hier war eine spontane proteolytische Eigenaktivität

zu beobachten. Pro g Rettich fanden sich 90 TIE, pro g Radieschen 85 TIE.

In Porree und Sellerie fanden sich keine Inaktivatoren. Die physiologische Bedeutung liegt wahrscheinlich in einem Schutz vor einem Überhandnehmen einer bakteriellen Proteolyse. Als Tierfutter dürften die erwähnten Pflanzen ohne großen Einfluß zu sein, da der Inaktivator vom Pepsin im Magen abgebaut wird.

III. Untersuchungen über Trypsin-Inaktivatoren in Bauchspeicheldrüsen verschiedener Tiere.

Bei den Untersuchungen von tierischem Gewebe interessierten uns im Hinblick auf die Pankreatitis speziell Inaktivatoren in Bauchspeicheldrüsen.

Bekannt und ausführlich beschrieben waren bisher nur die Inaktivatoren von KUNITZ und KAZAL, die beide aus Rinderpankreas gewonnen waren.

Es wurden zunächst verschiedene Spezies auf ihren Pankreas-Inaktivatorgehalt untersucht. Gefunden wurden niedermolekulare Inaktivatoren in allen untersuchten Spezies, so im Pankreas von Hund (400 TIE/g, vor und nach dem Enteiweißen), Schwein (400 TIE/g vor Enteiweißen, 800 TIE/g nach Enteiweißen), Rind und Kalb (200 TIE/g vor und 400 TIE/g nach Enteiweißen), Katze (1100 TIE/g vor und nach Enteiweißen) und Kaninchen (90 TIE/g vor und nach dem Enteiweißen).

Auffällig war der Befund, daß beim Rind und Schwein durch das Enteiweißen die Inaktivatorkonzentration zunahm, was die Vermutung nahelegt, daß bei diesen Spezies zwei Inaktivatoren vorliegen, deren einer in irgend einer Weise gebunden ist

und erst durch das Enteiweißen freigesetzt wird.

Der Inaktivatorgehalt wurde mit Hilfe der BAPA-Methode bestimmt. Dabei ergab sich, daß die Bildung des inaktiven Trypsin-Inaktivator-Komplexes sehr rasch vor sich geht und praktisch unabhängig von der Inkubationszeit ist. So ergab die Messung den gleichen Hemmgrad, wenn der Inaktivator statt 30 Minuten nur 1 Minute mit dem Trypsin inkubiert wurde. Bei Verwendung von Puffer, dem Ca^{++} zugesetzt war (Gesamtkonzentration an Ca^{++} : 0,05m), fand sich jedoch eine starke Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Schon nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C war der Extinktionswert des eingesetzten Trypsins überschritten und stieg bei Verlängerung der Inkubationszeit immer weiter an. Setzte man dem Ansatz eine kleine Menge (1/1000 Mol) EDTE (Äthylendiamintetraessigsäure) zu, das das Ca^{++} durch Komplexbildung abfängt so trat dieser Effekt nicht auf. Man kann daraus schließen, daß ganz offensichtlich in Gegenwart von Ca^{++} Trypsinogen zu Trypsin aktiviert wird, zumal noch das freigewordene Trypsin durch Zusatz von Trasylol und SBI gehemmt werden kann. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von HAVERBACK (1) überein, der fand, daß Trypsinogen durch Spuren aktiven Trypsins in Gegenwart einer Mindestkonzentration von Ca^{++} (4mVal/l) aktiviert wird.

Ein Zusatz von Ca^{++} zur Stabilisierung des eingesetzten Trypsins ist somit wenig sinnvoll bei Inhibitorbestimmungen im Homogenat. Eine Stabilisierung des Trypsins ist nach unseren Messungen auch nicht nötig. Bei Inkubation von Trypsin mit dem verwendeten TRAP-Puffer (0,2m, pH = 7,8) bei 37°C war das Trypsin über 5 Stunden ohne Aktivitätsverlust haltbar. Es war sogar eine langsame Aktivitätszunahme

zu beobachten, wenn die Trypsin-Stammlösung über mehrere Stunden im Eisbad aufgehoben wurde, sicherlich verursacht durch ein Aktivwerden von inaktivem Trypsin.

Bei Bestimmungen von nicht enteiweißtem Pankreas-Homogenat trat beim Zusetzen von BAPA zu einer Lösung von Homogenat und Puffer eine spontane proteolytische Aktivität auf, die während der ersten Minuten besonders hoch war. Da diese spontane Aktivität im "Pankreatitis-Homogenat" vom Hund größer war als im "normalen" Homogenat, besteht möglicherweise ein Zusammenhang mit dem Pankreatitis-Geschehen.

Es wurde ohne Erfolg versucht zu klären, welches Enzym die BAPA-Spaltung hervorruft. Der Verdacht auf freies Trypsin bestätigte sich nicht, da sich das unbekannte Enzym durch Trasylol und SBI nicht hemmen ließ. Beim Einsetzen von doppelter und dreifacher Homogenatmenge verdoppelten bzw. verdreifachten sich entsprechend die Extinktionswerte. Die Zugabe von Trasylol selbst in großem Überschuß beeinflusste nicht die spontane BAPA-Spaltung durch das Homogenat, wenn nicht inkubiert wurde. Auch bei Einsetzen von nur Homogenat ergab sich bei verschiedenen Inkubationszeiten (bis 100 Minuten) keine Extinktionsänderung. Bei Zugabe von einem Überschuß Trasylol dagegen zeigte sich überraschend, daß durch Vorinkubieren bei 37°C (bis 170 Minuten) eine starke Aktivierung des unbekannten Enzyms erfolgt. Besonders der Extinktionswert der ersten Minuten war extrem hoch. Auch jetzt war ein rascher Aktivitätsabfall zu beobachten. Bei Verwendung von SBI zeigte sich dieses Phänomen nicht.

Versuche, das unbekannte Enzym zu identifizieren, scheiterten, jedoch konnte entdeckt werden, daß BAPA nicht spezifisch für Trypsin (und Papain) ist. Es wurde gefunden, daß die Enteropeptidase in einem Mengenverhältnis, wie es zur Trypsinogen-Aktivierung verwendet wird (3 mg pro Ansatz), entweder selbst BAPA zu spalten vermag, oder aber eine Verunreinigung enthält. HAVERBACK (1) fand, daß BAPA durch Enteropeptidase nicht gespalten wird. Diese "Enteropeptidase"-Aktivität ist mit Trasylol hemmbar, könnte also durch eine Trypsin- oder Collagenase-Verunreinigung hervorgerufen sein; denn Collagenase vermag ebenfalls BAPA zu spalten. Die Collagenase kann aber nicht das unbekannte Enzym sein, da sich ihre Aktivität im Gegensatz zu der des unbekannten Enzyms durch Trasylol und SBI hemmen läßt. Die Ergebnisse von HÖRMANN (121) beruhen sicherlich auf einem Irrtum.

Elastase und Kathepsin C vermochten BAPA nicht zu spalten. Carboxypeptidase greift BAPA an, allerdings erst in großer Konzentration, sodaß auch hier an eine Verunreinigung gedacht werden muß.

IV. Isolierung des Hunde-Pankreas-Inaktivators aus Saft und Homogenat.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, den Trypsin-Inaktivator aus Hunde-Pankreas zu isolieren. Dieser Inaktivator ist deshalb von besonderem Interesse, da der Hund bei der Erzeugung einer experimentellen Pankreatitis meist als Versuchstier dient. Viele Erkenntnisse vom Wesen der Pankreatitis sind im Hunde-Experiment gewonnen worden.

Es ist deshalb wichtig zu wissen, wie der Trypsin-Inhibitor als wichtigster Faktor bei der Verhütung einer Trypsin-Freisetzung beschaffen ist, welche Eigenschaften er hat, und in welcher Weise er wirkt. Auch scheint die Ähnlichkeit zum menschlichen Pankreas-Inaktivator (HAVERBACK und eigene Untersuchungen) größer zu sein als die zum Kunitz'schen Rinder-Pankreas-Inhibitor.

Wichtig erscheint auch ein Vergleich mit dem Trasylol, das die Autolyse des Pankreas nur geringgradig zu hemmen vermag, und das heute bei der Pankreatitis in der Klinik allgemein angewendet wird.

Der Pankreas-Inaktivator wird in den Saft sezerniert. Um herauszufinden, ob die Inaktivatoren im Homogenat und im Saft identisch sind, wurden sowohl Homogenat als auch Saft aufgearbeitet und die Inhibitoren isoliert.

Zunächst sollen nun die Saftgewinnung und die Reinigungsschritte beschrieben werden.

a) Saftgewinnung

Ein mit 20 - 30mg Morphinum praemedizierter Hund wird mit 5 - 10 ml Pernocton narkotisiert, auf dem Operationstisch in Rückenlage gebracht und intubiert. Eine vena femoralis wird freigelegt und eine Dauerkanüle eingebunden.

Durch einen 20 cm langen Medianschnitt (10 cm unterhalb des Sternums) wird mit einem Skalpell die Bauchhöhle eröffnet. Danach werden das große Netz, Dickdarm- und Dünndarmschlingen nach links geklappt, sodaß das Duodenum sichtbar wird.

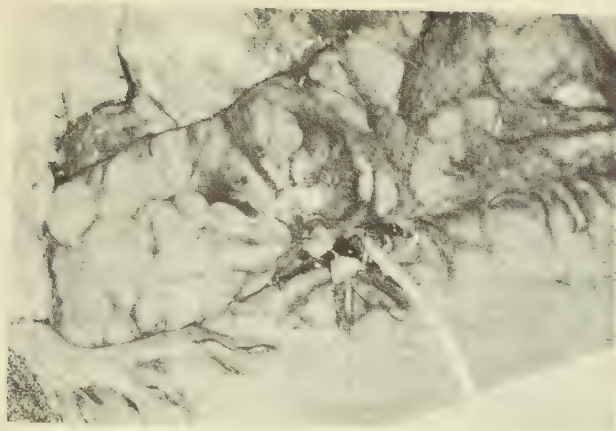
In der Duodenalschlinge liegt das Pankreas, das durch das gelappt-drüsige Aussehen und seine rosa Farbe gut gegen

das umgebende Fettgewebe abgrenzbar ist.

Gewöhnlich finden sich zwei Ausführungsgänge, ein großer, der meist mit dem Ductus Choledochus in der Papilla Vateri mündet und ein kleiner, durch den der Schwanzteil des Pankreas sein Sekret ausschüttet.

Der Ductus pancreaticus maior wurde an seiner Einmündungsstelle in das Duodenum freipräpariert. Um ein Eindringen von Duodenalsaft in die Bauchhöhle zu verhindern, wurde er zunächst unterbunden und dann durchtrennt. Ein dünner Kunststoffschlauch wurde etwa 2 - 3 cm in den Ductus eingeführt und mit Zwirn befestigt (Abb. 4 und 5). Der Schlauch wurde nach außen in ein Gefäß geleitet, das mit Eis gekühlt war. Danach wurde die Bauchhöhle mit Klammern verschlossen. Eine Dauertropfinfusion wurde angeschlossen, durch die dem Hund während der Dauer der Narkose durch die in der vena femoralis liegende Kanüle Flüssigkeit und Elektrolyte zugeführt wurden. Als Pankreas-Sekretionsreiz eignet sich besonders gut ein Gemisch von Sekretin, das die Ausschüttung des Sekrets stimuliert und Pankreozymin (Cecekin), das die Neubildung von Enzymen anregt. Alle 15 - 20 Minuten wurden etwa 2 ml eines 1 : 1-Gemisches in die vena femoralis appliziert. Nach 40 - 45 Sekunden begann darauf jeweils der Speichelfluß.

Maximal wurde eine Sekretionsgeschwindigkeit von 50 Tropfen pro Minute erreicht. In der ersten Stunde war das Sekret sehr mucös und fadenziehend, auch war die Sekretmenge gering (mit dem Gewicht des Hundes schwankend ca. 15 ml).



Pankreas

Duodenum

Abb. - 4 -
Einbringen des Schlauches in den Ductus pancreaticus maior



Pankreas

Schlauch im
Duct. pancr. maior

Duodenum

Abb. - 5 -
Unterbindung der Einmündungsstelle des Ductus
pancreaticus maior ins Duodenum

Nach der ersten Stunde wurde das Sekret dünnflüssiger und die produzierte Saftmenge betrug bei einem großen Hund (30 kg Körpergewicht) über Stunden konstant etwa 40 ml pro Stunde, nach 6 Stunden Sekretionsdauer verringerte sich die Sekretmenge.

Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit der Inaktivatorausschüttung von der Sekretionsdauer, sowohl die Konzentration/ml Saft als auch die Gesamtmenge in einer bestimmten Zeit.

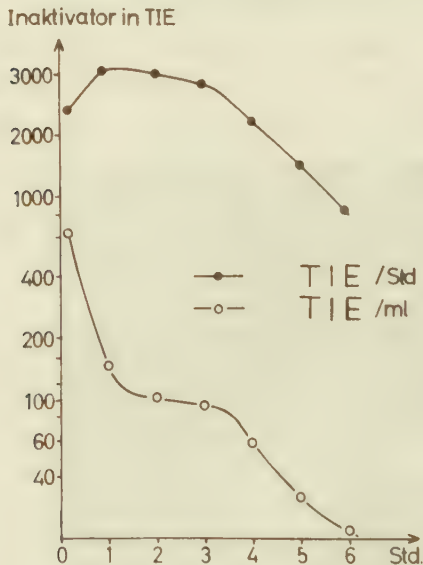


Abb. - 6 -

Abhängigkeit der Inaktivator-Ausschüttung von der Sekretionsdauer, dargestellt im logarithmischen Maßsystem.

Der in den ersten 10 Minuten produzierte Saft war besonders mucös. Er enthielt auch besonders viel Inaktivator

(600 - 700 TIE/ml. Nach einer Stunde war die Inaktivator-Konzentration pro ml Saft stark abgefallen, hielt nun aber diese Konzentrationsstufe für weitere $2\frac{1}{2}$ Stunden.

Obwohl die in der ersten Stunde produzierte Saftmenge weit geringer war als die in den folgenden Stunden, fanden wir dennoch bis zum Ende der ersten Stunde eine Zunahme der Inaktivator-Gesamtausscheidung. Auch diese blieb während der nächsten $2\frac{1}{2}$ Stunden nahezu konstant.

Nach der dritten Stunde fiel sowohl die Inaktivatormenge pro ml als auch die Gesamtmenge rasch ab.

Wie die folgende, der Abb. - 6 - zugrunde liegende Wertetabelle zeigt, ist es zur Inaktivatorgewinnung nicht lohnend, länger als 5 - 6 Stunden das Pankreas-Sekret zu sammeln.

Produzierter Saft in der	Menge in ml	Inaktivatorgehalt	
		TIE/ml	TIE/Stunde
in 10 Minuten	4	660	2640
1. Stunde	+11	144	4225
2. Stunde	40	100	4000
3. Stunde	40	92	3680
4. Stunde	40	58	2320
5. Stunde	40	34	1360
6. Stunde	35	20	700

Nach 11 Stunden Sekretion fanden sich nur noch 14 TIE pro ml Saft.

Bei den zur Saftgewinnung meist verwendeten kleinen Hunden war die Ausbeute erheblich geringer. Es fand sich hier nur eine durchschnittliche Inaktivatorkonzentration von 30 ± 10 E pro ml Saft bei einer sechsständigen Sammelperiode-

Der während der Sammelperiode zur Verhinderung einer Trypsinogenaktivierung bei 0°C gehaltene Saft wurde eingefroren und lyophilisiert; das Lyophilisat wurde gesammelt und in einer Kühltruhe bei -20°C aufgehoben.

Der Hundepankreassaft (HPS) hat physiologischerweise ein pH von 8,2 - 8,4. Bedingt durch eine pH-Verschiebung bei der Gefriertrocknung reagiert das in wenig Wasser gelöste Lyophilisat sehr stark alkalisch. Da ganz allgemein die Inaktivatoren im alkalischen Milieu instabil sind, ist es daher nicht ratsam, das Lyophilisat in Wasser zu lösen. Besser ist ein sofortiges Neutralisieren mit Säure.

Bei der Isolierung des Inaktivators ist es von größter Wichtigkeit, ein Aktivwerden von Trypsinogen zu verhindern, weil der Inaktivator mit freiem Trypsin einen inaktiven Komplex bildet, der sich dem Nachweis entzieht. Durch das Einengen des HPS wird nicht nur der Proteingehalt, sondern auch die ohnehin hohe Salzkonzentration und damit gleichzeitig die Ca^{++} -Konzentration erhöht, sodaß die Gefahr einer Trypsinogenaktivierung durchaus gegeben ist.

Es wurde zunächst versucht, im Nativsaft den Inaktivator säulenchromatographisch vom Trypsinogen zu trennen. Dazu wurde unter möglichst schonenden Bedingungen im Kühlraum bei 0°C gearbeitet.

In vielen Fällen gelang es, ein Aktivwerden des Trypsinogens auf der Säule zu verhindern, jedoch konnte in über 50 Ansätzen bei Gelfiltration mit Sephadex G 25 und G 50, mit

Hilfe von Anionen- und Kationen-Austauschern der Inaktivator nicht quantitativ vom Trypsinogen getrennt werden. Dies könnte dadurch verursacht sein, daß im Nativsaft der Inaktivator in irgendeiner Form locker an das Trypsinogen gebunden ist. Näherliegend ist aber die These, daß sich die Proteine durch den Salzzug bei der Gelfiltration assoziieren. Erhärtet wird diese Annahme dadurch, daß sich bei der Gelfiltration - wie auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte erwartet werden kann - Inaktivator und Trypsinogen quantitativ voneinander trennen lassen, wenn man als Elutionsmittel statt Wasser eine gepufferte Salzlösung verwendet.

Die photometrisch aufgezeichnete Kurve bei der Gelfiltration mit Sephadex G 50 ergibt dann folgendes Bild:

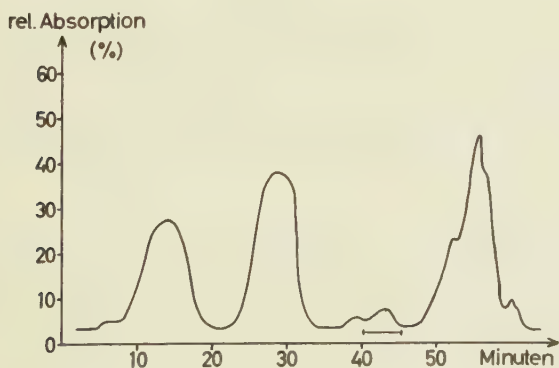


Abb. - 7 -

Fraktionierung eines Lyophilisats aus HPS an Sephadex G 50.

↔ = Inaktivator

Einfacher ist es, das Trypsinogen durch Enteiweißen von vornherein auszuschalten.

Wie in Vorversuchen festgestellt wurde, wird das Trypsinogen durch die gewöhnlich angewendete Enteiweißungsmethode mit 2,5%iger TES oder HClO_4 nicht quantitativ gefällt.

Es wurden daher mit einer Trypsinogenlösung Versuche angestellt, Bedingungen zu finden, unter denen das Trypsinogen restlos ausgefällt wird. Ein positives Ergebnis konnte erzielt werden, wenn mit einer 3%igen HClO_4 -Lösung enteiweißt und zusätzlich 1 Minute auf 60°C erhitzt wurde.

Da, wie sich in weiteren Versuchen zeigte, der Hunde-Pankreas-Inaktivator sehr säure- und hitzestabil ist, konnte diese Methode auf die HPS-Enteiweißung und damit Trypsinogen-ausschaltung angewendet werden.

b) Präparation des HPS-Inaktivators.

Enteiweißung:

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des Inaktivators aus HPS dienten 60 g des lyophilisierten Saftes, die 300 000 TIE enthielten.

Bei einem Homogenat, das weit weniger alkalisch ist als der lyophilisierte Saft, genügte es, das Homogenat zur Enteiweißung mit der gleichen Menge einer 6%igen HClO_4 -Lösung zu versetzen, um eine Endkonzentration von 3%iger HClO_4 zu erreichen. Beim lyophilisierten Saft ist diese Menge nicht ausreichend, da ein großer Teil der Säure zur Neutralisation verbraucht wird. Es wurde daher ein Überschuß einer 6%igen HClO_4 verwendet.

Das lyophilisierte Pulver wurde in ein großes Becherglas

gegeben und unter ständiger Kühlung mit 300 ml einer 6%igen HClO_4 versetzt. Die Lösung hatte ein pH von 0,3 - 0,5, was einer 3%igen HClO_4 -Lösung entspricht.

In einer Kühlzentrifuge wurde 20 Minuten lang bei einer Umdrehungszahl von 5500 zentrifugiert, danach der Niederschlag verworfen. Der wasserklare Überstand wurde möglichst rasch in einem Erlenmeyer-Kolben auf 60°C erhitzt und eine Minute lang bei dieser Temperatur gehalten.

Danach wurde im Eisbad abgekühlt und der entstandene Niederschlag erneut abzentrifugiert. Die saure Lösung wurde nun mit einer 2,5m K_2CO_3 -Lösung bis pH 5,5 neutralisiert, wobei große Mengen Kalium-Perchlorat ausfielen und CO_2 entwich. Es wurde nicht bis pH = 7 neutralisiert, da sich herausstellte, daß nach dem anschließenden Lyophilisieren eine Lösung des Pulvers alkalisch reagierte. Das ausgefallene Perchlorat wurde abzentrifugiert und die wasserklare, gelb gefärbte Lösung lyophilisiert.

Das Lyophilisat wurde als Ausgangsmaterial für die anschließende chromatographische Reinigung genommen:

Zuerst wurde eine Gelfiltration mit Sephadex G 25 durchgeführt. Verwendet wurde eine 50 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 4,2 cm. Als Elutionsmittel wurde aqua bidest. verwendet.

Das enteweißte Lyophilisat wurde in 10 ml aqua bidest. gelöst, der salzige Niederschlag abzentrifugiert und die stark gelb gefärbte, aber klare Lösung auf die Säule aufgetragen. Die Tropfgeschwindigkeit bei der Elution mit aqua bidest. betrug 60 Tropfen pro Minute. Das wäßrige Eluat wurde fraktioniert und die Proteinabsorption bei einer

Wellenlänge von 260 mμ photometrisch aufgezeichnet. Mit Hilfe der Gelfiltration gelang es, nicht nur die Salze abzutrennen, sondern auch die intensiv gelbe Farbe, die auf der Säule weit zurückblieb.

Die Inaktivatorfraktion, die mit Hilfe der BAPA-Methode ausgetestet wurde, konnte schon bei diesem Schritt von vielen Begleitproteinen abgetrennt werden.

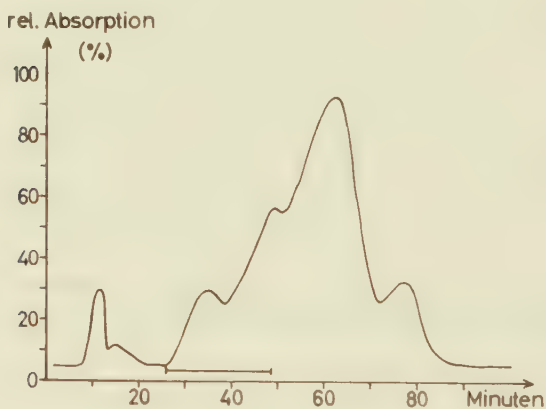


Abb. - 8 -

Sephadex G 25 - Gelfiltration des enteweißten HPS-Lyophilisats. $\longleftrightarrow$ = Inaktivator

Diese salzfreie Fraktion (von 300 000 TIE waren noch 272 000 TIE vorhanden) wurde in einem zweiten Reinigungsschritt an CM-Cellulose, einem Kationenaustauscher fraktioniert.

Als basischer Stoff wurde der Inaktivator auf der Säule festgehalten.

Die Cellulose-Ionenaustauscher sind vorteilhafter als die herkömmlichen Ionenaustauscher; bei den konventionellen

wird höchstmögliche Oberflächenkonzentration der austauschenden Gruppen angestrebt, wobei ein chemisch und mechanisch stabiles Kohlenwasserstoffgerüst Dauerverwendung selbst unter rauen Bedingungen zu gewährleisten hat. Demgegenüber tragen die neuen Cellulose-Ionenaustauscher schwach ionisierte Gruppen lose verstreut am weitmaschigen, hydrophilen, durch H-Brücken zusammengehaltenen Netzwerk der Cellulosemolekeln. Daraus resultiert leichte Zugänglichkeit der Austauschergruppen, welche locker gebunden werden und sich unter sehr schonenden Bedingungen wieder selektiv eluieren lassen. Die Kapazität ist sehr groß, bei Proteinen bis zu 50% des Eigengewichtes des Austauschers.

Wir benutzten eine Säule von 20 cm Länge und einen Durchmesser von 2 cm. Als Fließmittel verwendeten wir einen 1/100m Phosphat-Puffer mit einem pH von 5,6, mit dem das Säulenmaterial vorher ins Gleichgewicht gesetzt wurde.

Das den Inaktivator enthaltene Eluat der Sephadex-Säule (ca. 100 ml) wurde auf die CM-Cellulose aufgetragen, danach mit Puffer nachgewaschen.

Im durchlaufenden Anionenpeak fand sich kein Inaktivator. Die festgehaltene Kationenfraktion wurde anschließend mit einer 2,5%igen NaCl-Lösung graduierend eluiert.

Bei der Gradienten-Elution wird eine bestimmte Menge Puffer vorgelegt (in unserem Fall 200 ml), zu welchem man die Salzlösung unter Rühren langsam zutropfen läßt. Dadurch wird erreicht, daß die Salzkonzentration nur langsam und kontinuierlich ansteigt, wodurch die Proteine zuerst eluiert werden, die am lockersten an die Säule gebunden sind.

Die Absorption ergab folgendes Bild:

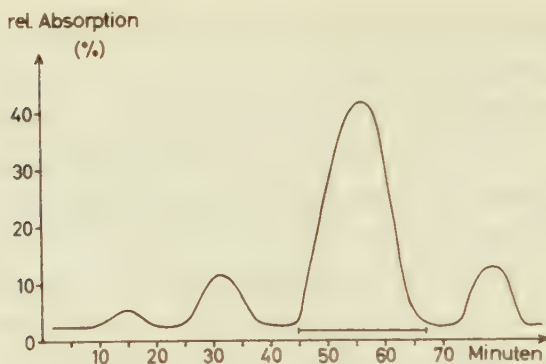


Abb. - 9 - (siehe Text)

Fraktionierung der Inaktivatorfraktion an CM-Cellulose, Gradientenelution mit 0,5%iger NaCl-Lösung. — = Inaktivator

Die Inaktivatorfraktion wurde anschließend lyophilisiert. Das trockne Pulver wurde in möglichst wenig Wasser gelöst (2 ml) und zur Entsalzung erneut über Sephadex G 25 gegeben. Gleichzeitig konnte durch diesen Schritt erneut Begleitprotein abgetrennt werden (Abb. - 10 -).

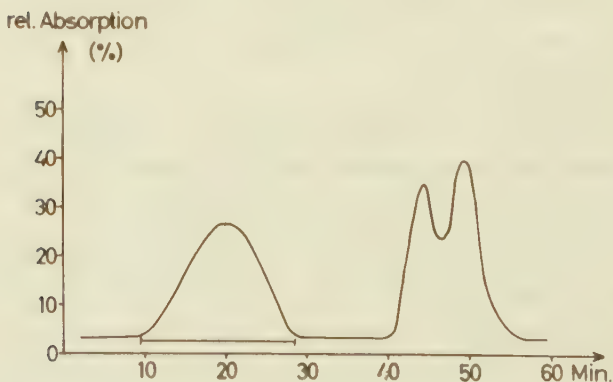


Abb. - 10 -

Sephadex G 25-Gelfiltration der Inaktivatorfraktion von CM-Cellulose. — = Inaktivator

Übersicht über die Reinigungsschritte.

Reinigungs- schritt	Gesamtaktivität in TIE	Spez. Aktiv. µg Prot./TIE	Gesamt- Ausbeute (%)
60 g lyophilisierter HPS	300 000	1040	100
Enteiweißen u. Lyophilisieren	272 000	5,1	90,7
Sephadex G 25	200 000	-	66,6
CM-Cellulose	200 000	0,19	66,6
Sephadex G 25	180 000	0,17	60,0

Die Proteinkonzentration wurde nach einer photometrischen Methode bestimmt, die von WARBURG und CHRISTIAN schon 1942 angegeben wurde (125).

Dabei wird die Proteinabsorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 mµ gemessen und die erhaltenen Werte in die Formel eingesetzt:

$$\text{Extinktion}_{280} \times 1,55 - \text{Extinktion}_{260} \times 0,755$$

Das Ergebnis erhält man in mg pro ml.

Diese Formel, die auf der Absorption vornehmlich der aromatischen Aminosäuren basiert, gilt streng genommen nur für Proteine, nicht für Polypeptide. Doch da auch hier mit der Formel:

$$(\text{Extinktion}_{215} - \text{Extinktion}_{225}) \times 144 = \mu\text{g Protein/ml}$$

die auf der Absorption der Peptidbindungen basiert, der gleiche Wert gefunden wurde, und außerdem die spezifische

Aktivität mit der anderer reiner Präparate von ähnlichen Molekulargewichten übereinstimmt, kann der Endwert von 0,17 μg Protein/TIE als sehr wahrscheinlich angenommen werden.

Mit diesem gereinigten Präparat ließen sich pro mg Inaktivator 2,12 mg Trypsin hemmen.

Elektrophoretisch ergaben sich **zwei** aktive Zonen, außerdem aber geringe Verunreinigungen, so daß eine Feinreinigung hätte angeschlossen werden müssen, die jedoch wegen Mangel an Substanz nicht mehr durchgeführt werden konnte.

c) Präparation des Hunde-Pankreas-Homogenat- (HPH)- Inaktivators.

Als Ausgangsmaterial für eine Präparation dienten 2 kg Hunde-Pankreas. Das Pankreas eines großen Hundes wiegt zwar durchschnittlich 50g, jedoch konnten wir meist nur kleinere Hunde bekommen, deren Pankreasgewicht zwischen 20 und 30g lag. Die 2 kg sind somit die Bauchspeicheldrüsen von etwa 50 Hunden.

Die Bauchspeicheldrüsen wurden unmittelbar post mortem herausgeschnitten und in einer Kühltruhe bei -20°C eingefroren, bis eine größere Menge gesammelt war.

In Vorversuchen zeigte sich, daß 1 g Hundepankreas durchschnittlich 400 TIE enthält und daß beim Enteiweißen nur geringe Mengen verlorengehen.

Interessant ist die Tatsache, daß in den Bauchspeicheldrüsen der Hunde, bei denen vorher durch Pankreas-Stimulierung Saft gewonnen wurde, die Inaktivatorkonzentration um 30 - 40% niedriger lag als bei den übrigen Hunden.

Jeweils 250 g Pankreasgewebe wurden in halb gefrorenem Zustand im Fleischwolf zerkleinert und mit 250 ml Eiswasser versetzt. Das Gemisch wurde im Star-Mix 1 Minute lang homogenisiert und zur Enteiweißung mit 500 ml einer 6%igen Perchlorsäure (eisgekühlt) versetzt, so daß die Endkonzentration der einer 3%igen HClO_4 entsprach. Nach weiterem 3 minütigem Homogenisieren wurde das Homogenat in einer Kühlzentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 5300 zwanzig Minuten lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde in einem eisgekühlten Gefäß gesammelt, der Niederschlag erneut im Star-Mix homogenisiert, da er noch etwa ein Drittel der Gesamtmenge des Inaktivators enthielt. Der Niederschlag wurde mit 100 ml Eiswasser versetzt und 200 ml einer 6%igen HClO_4 , darauf 3 Minuten homogenisiert. Nach 20 minütigem Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge wurde der Niederschlag verworfen, der Überstand mit dem Extrakt des ersten Aufschlusses zusammengegeben.

Diese schwach gelb gefärbte, aber klare Lösung wurde nun möglichst rasch auf 60°C erhitzt und eine Minute bei dieser Temperatur gehalten, um das Trypsinogen quantitativ auszuschalten. Nach Abkühlen im Eisbad wurde der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert.

Die stark saure Lösung ($\text{pH} = 0,5 - 0,8$) wurde nun mit einer 2,5m K_2CO_3 -Lösung bis auf $\text{pH} = 6$ neutralisiert, was mit starker CO_2 -Entwicklung einherging. Das ausgefallene Perchlorat wurde abzentrifugiert, die wasserklare Lösung auf ihren Inaktivatorgehalt getestet und anschließend lyophilisiert.

Wie bei der Isolierung des HPS-Inaktivators wurde nach der

Enteweißung eine Gelfiltration mit Sephadex G 25 durchgeführt.

Diese Gelfiltration wurde in mehreren Schritten vorgenommen. Jeweils 15 g Lyophilisat wurden in 10 ml Wasser gelöst, der salzige Niederschlag abzentrifugiert und verworfen. In der sehr stark gelb gefärbten, aber klaren Lösung befanden sich jeweils 100 000 E Inaktivator. Die verwendete Säule hatte eine Länge von 90 cm und einen Querschnitt von 4,5 cm. Als Elutionsmittel diente aqua bi-dest. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 55 Tropfen pro Minute.

Die photometrisch geschriebene Absorptionskurve ergab folgendes Bild:

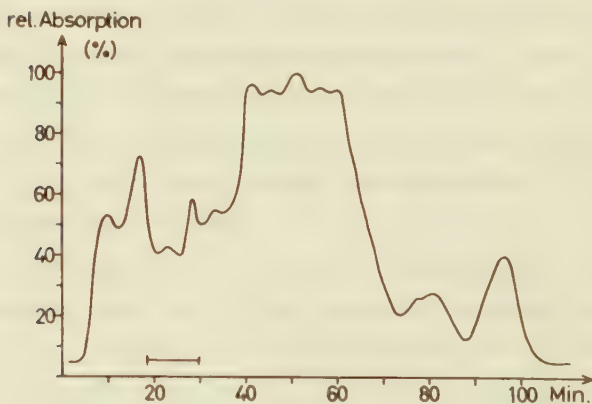


Abb. - 11 -

Protein-Absorptionskurve bei der Sephadex G 25 - Gelfiltration von lyophilisiertem HPH (siehe Text)

— = Inaktivator

Das Eluat wurde fraktioniert. Der Inaktivator konnte so vom größten Teil der Begleitproteine abgetrennt werden. Die Inaktivatorfraktionen von je zwei Sephadex-Säulen (ca. 300 ml) wurden anschließend auf eine 15 cm lange CM-Cellulose-Säule gegeben, die einen Querschnitt von 1,5 cm hatte. Als Elutionsmittel wurde ein 0,2m Phosphat-Puffer (pH = 6) verwendet. Die durchlaufenden sauren Proteine enthielten keinen Inaktivator. Auf der Säule waren zwei deutlich abgrenzbare Zonen zu sehen, eine gelbe und eine blaue. Die blaue, kupferhaltige Zone stammte wahrscheinlich aus dem Coeruloplasmin; diese konnte durch Waschen der Säule mit einer 1/1000m Titriplex-Lösung (Äthylen-diamin-tetraessigsäure als Dinatriumsalz, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$, Molekulargewicht = 372,25) entfernt werden.

Es war gut zu sehen, wie die blaue Zone verschwand. Insgesamt wurde mit zwei Säulenvolumen Titriplex gewaschen, danach mit zwei Säulenvolumen Puffer.

Nach der beim HPS beschriebenen Methode wurden die basischen Proteine mit einer 3%igen NaCl-Lösung graduierend eluiert. Abbildung - 12a - und 12b - zeigen die photometrisch aufgezeichneten Proteinabsorptionskurven:

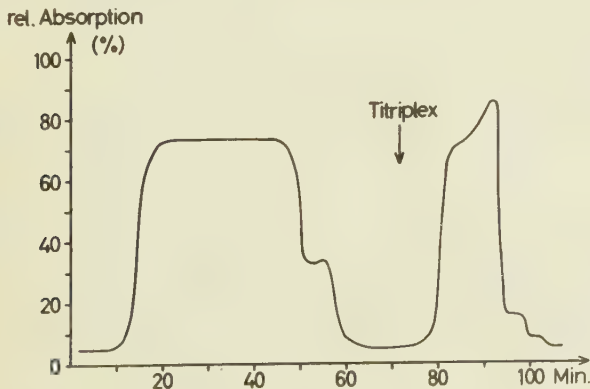


Abb. - 12a -
Fraktionierung an CM-Cellulose, saure Proteinfraktion
ohne Inaktivator. (Näheres siehe Text)

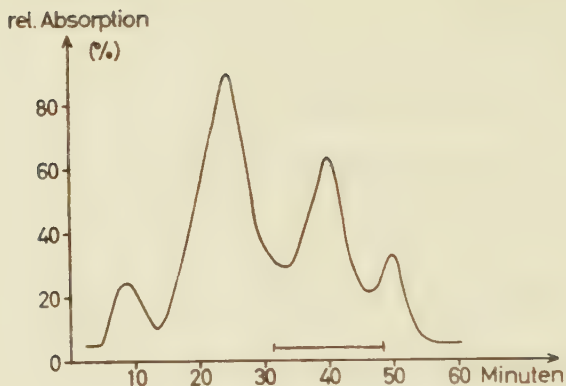


Abb. -12b -

Fraktionierung an CM-Cellulose

Basische Proteinfraction mit einer 3%igen NaCl-Lösung
graduierend eluiert. (Näheres siehe Text)

— = Inaktivator

Die Inaktivatorfraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. Von den 680 000 E in der Ausgangssubstanz waren noch 560 000 E vorhanden.

Das lyophilisierte Pulver wurde in 10 ml Wasser aufgenommen, löste sich jedoch nicht. Es bildete sich ein bräunlicher gallertiger Niederschlag, in welchem sich auch der Inaktivator befand. Eine geringe Menge Inaktivator, die im Überstand geblieben war (30 000 E), wurde mit diesem verworfen.

Nach Zugabe von weiteren 10 ml Wasser löste sich der Niederschlag, der wohl wegen der extrem hohen Salzkonzentration nicht in Lösung gegangen war. Zur Entsalzung wurde die klare Lösung erneut über Sephadex G 25 gegeben. Dabei ließ sich weiteres Begleitprotein abtrennen (Abb. -13-).

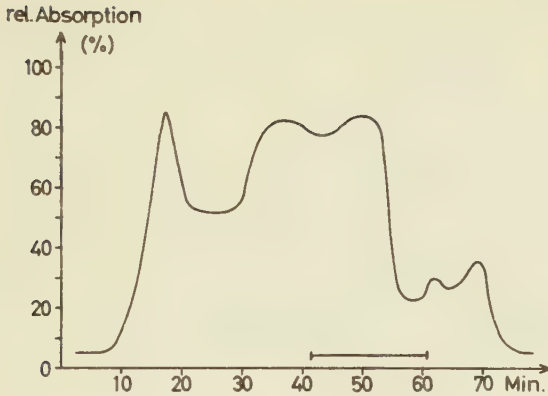


Abb. - 13 -

Entsalzung mit Sephadex G 25 (Näheres siehe Text).

— = Inaktivator

Eine erneute Fraktionierung an CM-Cellulose wurde angeschlossen (Abb. - 14 -) und abschließend mit Sephadex G 25 entsalzt. Bis zu diesem Reinigungsschritt ließ sich eine 730fache Anreicherung erzielen (Abb - 15 -).

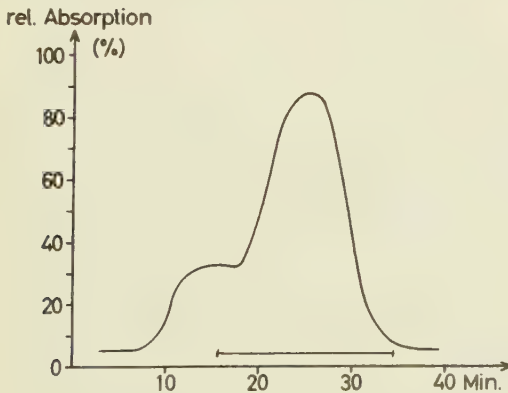


Abb. - 14 -

2. Fraktionierung an CM-Cellulose. (Näheres siehe Text)

— = Inaktivator

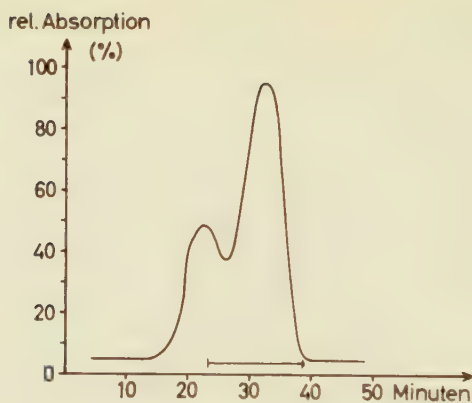


Abb. - 15 -
Näheres siehe Text. ←→ = Inaktivator

Übersicht über die Reinigungsschritte.

Reinigungsschritt	Gesamtaktivität in TIE	Spez. Aktiv. μg/TIE	Gesamt- Ausbeute (%)
2 kg Pankreas- homogenat	680 000	160	100
Enteiweißen	660 000	23	97
Sephadex G 25	560 000	14	83
CM-Cellulose	560 000	1,99	83
Sephadex G 25	525 000	0,93	74
CM-Cellulose	450 000	-	66
Sephadex G 25	360 000	0,22	53

Das säulenchromatographisch gereinigte Präparat war elektro-
phoretisch nicht einheitlich.

Zur Elektrophorese wurden Membranfolien von Schleicher und

Schüll verwendet, die den Vorteil haben, daß nur sehr kleine Substanzmengen benötigt werden und die Trennzeit erheblich kürzer ist als bei Verwendung der herkömmlichen Trägerpapiere.

Wir verwendeten einen 1/100m Boratpuffer, $\text{pH} = 8$, die Laufzeit betrug 3 Stunden bei 220 Volt.

Nach Anfärben mit einer Amido-Schwarz-Lösung ergab sich folgendes Bild:

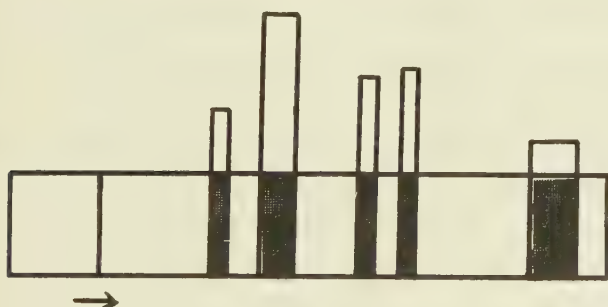


Abb. - 16 -

Membranfolienelektrophorese des HPS-Inaktivators nach der säulenchromatographischen Reinigung. Dem Farbgehalt der Zonen entsprechen die verschiedenen Säulenhöhen. Deutlich erkennbar kam es zu einer Auftrennung in fünf verschieden stark gefärbte Zonen.

Es wurde jeweils nur eine Hälfte der Membranfolie angefärbt, aus der zweiten Hälfte wurden nach Markierung der Zonen diese getrennt ausgeschnitten und mit einer Natriumacetatlösung ($1/15\text{m}$, $\text{pH} = 7,5$) eluiert.

In Zone 1, 2 und 5 fand sich keine Aktivität, dagegen waren

überraschend sowohl Zone 3 als auch Zone 4 aktiv. Beide Zonen enthielten je 50% der Gesamtaktivität.

Die gute Trennung ermutigte zu einer elektrophoretischen Feinreinigung in größerem Maßstab. Wir verwendeten Folien von der Größe 280 x 350 mm. Pro Folie wurden 2 mg der säulenchromatographisch vorgereinigten Substanz aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

Nach Anfärbung der beiden Randstreifen und eines Mittelstreifens wurden die aktiven Zonen markiert, getrennt ausgeschnitten und eluiert.

Nach dieser Reinigung standen uns je 30 000 TIE zur Verfügung. Bei der anschließenden Entsalzung über Sephadex G 50 gingen rund 50% der Aktivität verloren.

Mit der restlichen Substanz wurde eine Endgruppenbestimmung unternommen. Dabei zeigte sich, daß weitere Verunreinigungen vorhanden waren, so daß keine exakte Aussage über die Endgruppen der aktiven Substanzen möglich war.

Mit einiger Wahrscheinlichkeit ist aber Asparaginsäure oder Glutaminsäure die Endgruppe einer der beiden aktiven Substanzen (gefolgert aus der mengenmäßigen Verteilung der papierchromatographisch identifizierbaren Dinitrophenylaminosäuren).

Da dieser Weg nicht zum Ziel führte, wurde versucht, über den Trypsin-Inaktivator-Komplex mit anschließender Trennung in die Einzelkomponenten zu einem reineren Präparat zu gelangen.

Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Menge Trypsin (jeweils 20 mg) in 2 ml 0,1m Ammonium-Acetat-Puffer, pH = 7,8, gelöst und soviel säulenchromatographisch vorgereinigter In-

aktivator hinzugefügt, bis alles freie Trypsin in den inaktiven Komplex übergeführt war, so daß mit der BAPA-Methode keine freie tryptische Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte.

Da der Inaktivator nur mit niedermolekularen Substanzen verunreinigt war, konnte nun der Komplex, der ein Molekulargewicht von 24 000 (Trypsin) + 7400 (Inaktivator) = 31 400 hatte, mittels einer Gelfiltration mit Sephadex G 50 leicht von den niedermolekularen Verunreinigungen abgetrennt werden.

Wir verwendeten eine 100 cm lange Säule mit einem Querschnitt von 2,5 cm und benutzten als Elutionsmittel einen 0,1m Ammoniumacetat-Puffer, pH = 7,8, mit dem vorher die Säule ins Gleichgewicht gesetzt worden war.

Die photometrisch aufgezeichnete Absorptionskurve (Abb.-17-) zeigt deutlich den weit vorauslaufenden Trypsin-Komplex-Peak, der sich durch Fraktionierung klar von den nachlaufenden Verunreinigungen abtrennen ließ.

Die den Komplex enthaltene Fraktion wurde anschließend lyophilisiert, wobei gleichzeitig der flüchtige Puffer entfernt wurde.

In einem weiteren Schritt mußte nun der Komplex wieder in seine aktiven Komponenten gespalten werden.

Die Komplextrennung erfolgt durch Ansäuern auf pH = 2.

Wir lösten den Komplex in 2 ml einer verdünnten Ameisensäure (pH = 2) und führten erneut eine Sephadex G 50 - Gelfiltration durch, nachdem die Säule mit der gleichen verdünnten Ameisensäure ins Gleichgewicht gesetzt worden war. Wir verwendeten wiederum eine 100 cm lange Säule mit einem Querschnitt von 2,5 cm. Als Elutionsmittel diente die ver-

dünnte Ameisensäure.

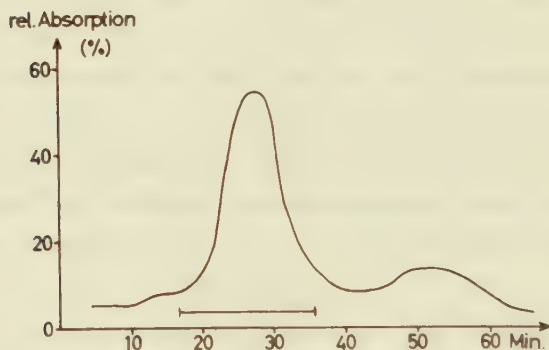


Abb. - 17 -

Trennung des Trypsin-Inhibitor-Komplexes von niedermolekularen Substanzen durch Gelfiltration mit Sephadex G 50.

— = Inaktivator-Komplex

Das aktive Trypsin mit dem jetzt größten Molekulargewicht lief der Inaktivatorfraktion weit voraus und konnte durch Fraktionierung quantitativ vom Inaktivator getrennt werden. Die photometrisch aufgezeichnete Absorptionskurve zeigt diesen Befund recht anschaulich (Abb. - 18 -).

Nachdem beim ersten Schritt der Komplexbildung alle niedermolekularen Verunreinigungen abgetrennt worden waren, und nun bei der Komplextrennung alle etwa noch vorhandenen höhermolekularen Verunreinigungen, so mußte theoretisch nach diesem Schritt der Inaktivator in reiner Form vorliegen. (Die flüchtige Ameisensäure wurde beim abschließenden Lyophilisieren entfernt).

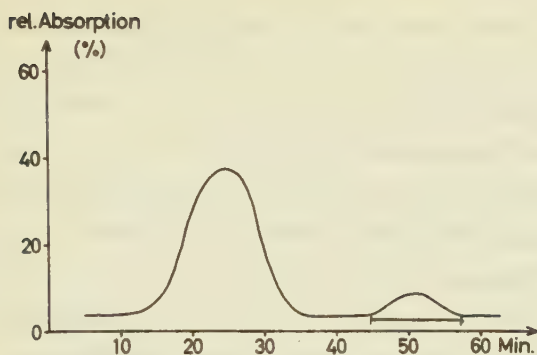


Abb. - 18 -

G 50 - Gelfiltration nach Spaltung des Trypsin-Inaktivator-Komplexes durch verdünnte Ameisensäure (pH = 2).

———— = Inaktivator

Versuche, den Inaktivator aus seiner Lösung durch Zugabe von Ammonium- und Magnesiumsulfat oder Aceton zu kristallisieren, mißlingen, so daß der HPI nur als amorphes Präparat erhalten werden konnte.

Anschließend wurde das elektrophoretische Verhalten des HPI untersucht.

Es wurden wiederum Membranfolien von Schleicher und Schüll verwendet, ein 1/100m Borat-Puffer, pH = 8, und eine Spannung von 220 Volt. Nach dreistündiger Laufzeit wurde mit Amido-Schwarz angefärbt.

Es zeigten sich drei deutlich voneinander getrennte Zonen, von denen die erste schwach angefärbt war, die zweite besonders intensiv und die dritte mäßig stark.

Die drei Zonen wurden markiert, getrennt, ausgeschnitten und eluiert.

Eine weitere Folie wurde quer zur Laufrichtung in 20 jeweils 3 mm breite Streifen geschnitten und jeder einzeln

eluiert. Danach wurde jeder auf seinen Inaktivatorgehalt geprüft.

Dabei zeigte sich, daß wie beim HPS-Inaktivator zwei Zonen aktiv waren, und zwar Zone 2 und 3.

Der geringe Inaktivatorgehalt, der bei der getrennten Elution der drei angefärbten Zonen in Zone 1 gefunden wurde, konnte als "Verschmier-Effekt" erklärt werden.

In der Abbildung - 19 - ist der elektrophoretische Befund wiedergegeben, wobei die Farbtintensität der angefärbten Zonen durch die unterschiedliche Säulenhöhe verdeutlicht wird. In der gleichen Abbildung ist die Lokalisation und die quantitative Verteilung des Inaktivators aufgezeichnet.

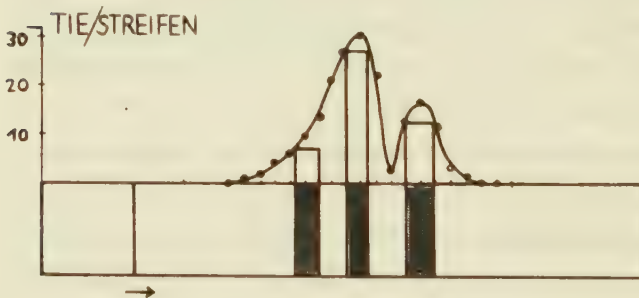


Abb. - 19 -

Membranelektrophoretische Trennung des HPH-Inaktivators in eine inaktive (1) und zwei aktive (2 und 3) Zonen. (Näheres siehe Text).

Die drei getrennt ausgeschnittenen Zonen wurden getrennt eluiert und lyophilisiert.

Anschließend wurden nach der Methode von SANGER (216) die Endgruppen bestimmt.

Dabei zeigte sich, daß trotz der optisch gut sichtbaren Trennung in einzelne Zonen doch geringe Mengen Protein der ersten Zone in der zweiten Zone und geringe Mengen der zweiten Zone in der ersten zu finden waren.

Dennoch konnte durch die Farbintensität der im Chromatogramm sichtbaren Dinitrophenyl-Aminosäuren die Endgruppe der Einzelkomponenten erkannt werden. Es wurden gefunden: für die inaktive erste Zone: Threonin, für die zweite, d.h. erste Inaktivatorzone: Asparagin- oder Glutaminsäure und für die dritte, d.h. zweite Inaktivatorzone: Threonin.

Für eine Aminosäurenanalyse reichte die Substanzmenge nicht aus. Ihre Durchführung bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten. Die Absorptionskurve des gereinigten Hunde-Pankreas-Inaktivators mit seinen zwei aktiven und seiner inaktiven Komponente hatte die für Proteine charakteristische Form (Abb.-20-)

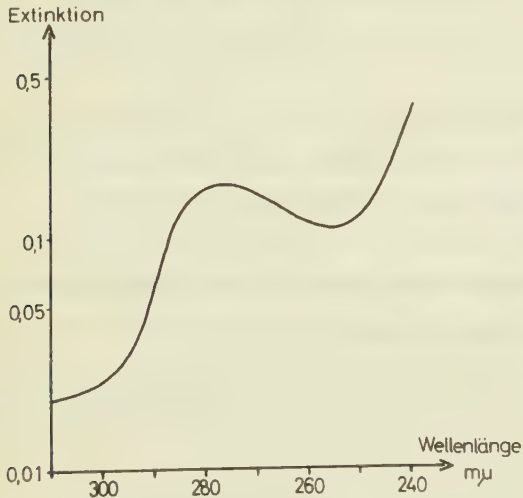


Abb. - 20 -

Absorptionskurve des gereinigten Hunde-Pankreas-Inaktivators.

Die der Abbildung - 20 - zu Grunde liegenden Werte wurden mit einem Zeiss-Photometer in einem Wellenlängenbereich zwischen 310 und 240 m μ gemessen, unter Verwendung von Quarzküvetten gegen aqua bidest. Die Inaktivatorlösung enthielt 33,7 μ g Protein pro ml. Sowohl nach der 260/280-Methode als auch nach der 215/225-Methode (siehe dort) ließ sich eine spezifische Aktivität von 0,15 μ g Protein pro Inaktivatoreinheit eruieren. Das bedeutet eine Anreicherung um das 1067fache. Dieser Reinheitsgrad spricht dafür, daß das Präparat keine Verunreinigungen mehr enthielt. Eine spezifische Aktivität von 0,15 μ g Protein/TIE bedeutet, daß 0,3 μ g des Präparates 1 μ g Trypsin vollständig zu hemmen vermögen. Daraus läßt sich das Molekulargewicht des Inaktivators errechnen, da dasjenige von Trypsin bekannt ist (24 000). Danach ergibt sich für den HPI ein Molekulargewicht von 7200. Dieser Wert weicht nur unerheblich von dem mit Hilfe der Gelfiltration mit Sephadex G 50 erhaltenen Wert ab.

Als Kunitz-Faktor ("optical factor"), der wie eingangs geschildert ein charakteristischer Faktor für jedes Protein ist, wurde ein Wert von 1,18 ermittelt.

V. Gemeinsame Eigenschaften der Inaktivatoren aus Saft und Homogenat.

Hinsichtlich der Eigenschaften der Inaktivatoren aus Saft und Homogenat ergaben sich keine Unterschiede. Deshalb seien ihre Eigenschaften gemeinsam beschrieben:

Das Hunde-Pankreas enthält im Durchschnitt 400 TIE pro g Gewebe, d.h. in 1 g Pankreas ist so viel Inaktivator, daß

200 μ g Trypsin zu 100% gehemmt werden können.

Aus einem Gramm Gewebe können maximal 8 - 10 mg Trypsinogen zu Trypsin aktiviert werden; das bedeutet, daß nur $1/40$ - $1/50$ des maximal freisetzbaren Trypsins gehemmt werden kann.

Beim Hunde-Pankreas-Saft ist es weniger leicht, einen Durchschnittswert für den sezernierten Inaktivator anzugeben, da, wie gezeigt werden konnte, die Inaktivatorkonzentration während der Sekretionsdauer beträchtlichen Schwankungen unterworfen ist. Legen wir aber den Mittelwert von 100 TIE pro ml zu Grunde und berücksichtigen, daß auch der Trypsinogengehalt des Saftes (Mittelwert: 4,5 - 5,0 mg pro ml) die gleiche Abhängigkeit von der Sekretionsdauer zeigt wie der Inaktivator, so ergibt sich, daß hier nur $1/90$ - $1/100$ des maximal freisetzbaren Trypsins inaktiviert werden kann.

Die Hemmung der proteolytischen Aktivität des Trypsins wurde mit Hilfe der ausführlich beschriebenen BAPA-Methode bestimmt. Zur Hemmung der esterolytischen Aktivität des Trypsins eignet sich als Substrat BAEE (Benzoyl-L-Arginin-Äthylester-Hydrochlorid). Dieser Test entspricht im Prinzip der BAPA-Methode. Es werden 12,9 mg BAEE in 12,5 ml Wasser gelöst und 0,5 ml dieser Lösung in den Test eingesetzt. Von der Trypsin-Stammlösung wird jeweils nur ein μ g genommen. In Quarzküvetten wird in einem Zeiss-Photometer bei einer Wellenlänge von 283 m μ gemessen und die Spaltung jeweils 15 Minuten an Hand der Extinktionsänderung verfolgt.

Es stellte sich heraus, daß die esterolytische Aktivität des Trypsins stärker gehemmt wird als die proteolytische, und zwar um 30%. Nach WERLE soll die esterolytische Akti-

vität des Trypsins ganz allgemein von den natürlich vorkommenden Inhibitoren stärker gehemmt werden als die proteolytische.

Mit Trypsin bildet der Hunde-Pankreas-Inaktivator einen reversiblen Komplex, der weder tryptische noch hemmende Aktivität zeigt. Dieser Komplex ist in einem weiten pH-Bereich stabil (getestet zwischen pH 2 und pH 12).

Nach Ansäuern auf pH 2 gelingt es aber, den Komplex durch Gelfiltration über Sephadex G 25 in seine aktiven Komponenten zu spalten.

Die trypsinhemmende Wirkung des HPI ist in einem weiten pH-Bereich gleichbleibend optimal, im Gegensatz zu der vieler anderer Inhibitoren, die oft in engen pH-Grenzen ein Hemm-Optimum besitzen.

Die pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung ließ sich natürlich nur in den pH-Grenzen der BAPA-Methode feststellen. Eine BAPA-Spaltung durch Trypsin ist möglich in einem Bereich zwischen pH = 5,5 und 11,5 (letzter gemessener Wert), mit einem Optimum zwischen pH = 7 und 8, da hier das Trypsin seine optimale Wirkung hat.

Man setzt im pH-Optimum der Methode einer bestimmten Menge Trypsin gerade so viel Inaktivator zu, daß eine 50%ige Hemmung resultiert. Dieses Mengenverhältnis hält man bei und nähert sich durch pH-Verschiebungen (mit Hilfe verschiedener Puffer) den pH-Grenzen der Methode und bestimmt aus dem jeweiligen Trypsin-Leerwert und dem Trypsin-Inaktivator-Wert das Hemmverhältnis.

Zwischen pH 5,5 und 10 ergab sich keine Änderung des Hemmverhältnisses. Erst bei einem pH über 10 verringerte es sich. Dies ist in Abbildung - 21 - graphisch dargestellt.

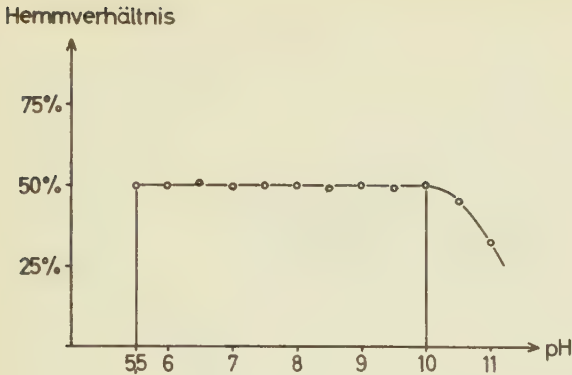


Abb. - 21 -

Graphische Darstellung des Hemmverhältnisses in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Eine wichtige Frage ist die nach der Art der Hemmung. Es kommen im allgemeinen zwei Arten (Grenzfälle) von Hemmungen vor, die kompetitive und die nicht kompetitive. Die kompetitive Hemmung wird durch steigende Substratkonzentrationen verringert. Es kann hierbei angenommen werden, daß der Inaktivator und das Substrat an der gleichen Stelle des Enzymmoleküls angreifen und sich gegenseitig verdrängen.

Bei der nicht kompetitiven Hemmung ändert sich der Hemmgrad nur mit der Inaktivatorkonzentration, ist also von der Substratkonzentration unabhängig. Ein Inhibitor, der eine nicht kompetitive Hemmung bewirkt, greift nicht das aktive Zentrum des Enzyms an, das bei der Reaktion mit dem Substrat von Wichtigkeit ist.

Bei der kompetitiven Hemmung vergrößert der Inhibitor die Michaeliskonstante, ohne die maximale Geschwindigkeit zu verändern, während bei der nicht kompetitiven Hemmung der

Inaktivator eine Verminderung der maximalen Geschwindigkeit bewirkt.

Bei unseren Messungen wurde eine bestimmte Menge Trypsin mit verschiedenen Mengen Substrat(BAPA) versetzt (von 0,1 - 1,5 ml) und die jeweilige Spaltung gemessen. Die gleiche Menge Trypsin wurde mit drei verschiedenen Mengen Inhibitor zusammengebracht, so daß eine 28%ige, eine 39%ige und eine 68%ige Hemmung resultierte und diese Ansätze ebenso mit unterschiedlichen Substratmengen versetzt.

Die erhaltenen Werte wurden nach LINEWEVER-BURK, wie in den Documenta Geigy angegeben (192), in ein Koordinatensystem eingetragen, bei dem die Abszisse den reziproken Wert der Substratkonzentration, die Ordinate den reziproken Wert der zugehörigen Photometer-Extinktion darstellte. Es ergaben sich vier Geraden, deren gemeinsamer Schnittpunkt auf der Ordinate lag.

Bei dieser Art der Darstellung liegt der Schnittpunkt dann auf der Ordinate, wenn die Hemmung kompetitiv ist. Somit konnte gezeigt werden, daß der HFI das Trypsin kompetitiv hemmt, zumindest bei der Verwendung von BAPA als Substrat. (Abb. - 22 -).

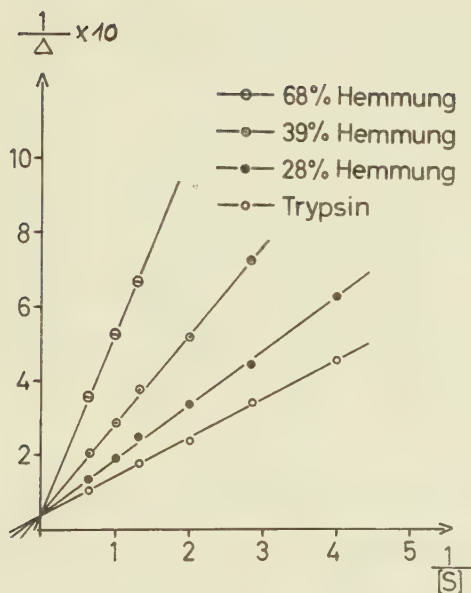


Abb. - 22 -

Bestimmung der Art der Hemmung nach dem im Text näher beschriebenen graphischen Verfahren.

Δ = Extinktion

S = Substrat

Wertetabelle für die Aufzeichnung der Hemmkurve:

(1) (ml)	(2) ($1/\text{ml}$)	(3) (ΔE)	(4) ($1/\Delta E$)	(5) (ΔE)	(6) ($1/\Delta E$)	(7) (ΔE)	(8) ($1/\Delta E$)	(9) (ΔE)	(10) ($1/\Delta E$)
1,50	0,667	0,098	10,2	0,064	15,7	0,047	21,3	0,028	35,8
1,00	1,000	0,058	17,3	0,050	20,0	0,034	29,5	0,019	52,6
0,75	1,330	0,057	17,6	0,040	25,0	0,026	38,5	0,015	66,6
0,50	2,000	0,043	23,3	0,030	33,3	0,020	50,0	0,010	100,0
0,35	2,850	0,030	33,0	0,024	41,7	0,004	71,5	0,007	143,0
0,25	4,000	0,022	45,5	0,016	62,6	0,010	100	--	--
0,10	10,000	0,010	100	--	--	--	--	--	--

(1) : eingesetzte Substratmenge in ml

(2) : reziproker Wert von (1) ($1/\text{ml}$)

(3) : Extinktion von 5 μg Trypsin, gemessen in 5 Minuten ($\Delta E/5 \text{ Min.}$)

(4) : reziproker Wert von (3) ($1/\Delta E$)

(5) : Extinktion von Trypsin + Inaktivator bei 28%iger Hemmung ($\Delta E/5 \text{ Min}$)

(6) : reziproker Wert von (5) ($1/\Delta E$)

(7) : Extinktion von Trypsin + Inaktivator bei 39%iger Hemmung ($\Delta E/5 \text{ Min}$)

(8) : reziproker Wert von (7) ($1/\Delta E$)

(9) : Extinktion von Trypsin + Inaktivator bei 68%iger Hemmung ($\Delta E/5 \text{ Min}$)

(10) : reziproker Wert von (9) ($1/\Delta E$)

Der Hunde-Pankreas-Inaktivator (HPI) ist in Form eines Trock-
 kenpulvers im Kühlschrank über Monate ohne Aktivitätsverlust
 haltbar. Auch in wässriger Lösung bei neutralem und saurem
 pH war im Kühlschrank bei 0°C über Wochen kein Aktivitäts-
 verlust feststellbar.

Der Inaktivator ist extrem säurestabil, eine Tatsache, die
 wir uns bei der Abtrennung von höhermolekularen Begleitpro-
 teinen zunutze machten. Nach Ansäuern einer Inaktivator-
 lösung auf pH = 0,3 konnten wir selbst nach 48 Stunden keine
 Abnahme der Aktivität feststellen.

Zur Frage, ob der Inaktivator auch im Alkalischen stabil ist,
 wurde eine Inaktivatorlösung auf pH = 11 eingestellt und bei
 0°C aufbewahrt. Es wurde eine langsame Aktivitätsabnahme
 beobachtet. Nach 21 Stunden waren nurmehr 50% des Inhibitors
 aktiv. Dieser Inaktivierungsvorgang konnte durch Ansäuern
 nicht rückgängig gemacht werden; im Alkalischen wird demnach
 der HPI langsam irreversibel denaturiert.

Der HPI zeichnet sich durch besonders große Hitzebeständig-
 keit aus. Davon machten wir bei der Isolierung des Inhibitors
 Gebrauch, indem wir nach der Zugabe von HClO_4 auf 60°C er-
 hitzten.

In einem Versuch wurde eine Inaktivatorlösung (pH = 6) stei-
 genden Temperaturen ausgesetzt, ohne daß sich ihre Aktivität
 verminderte. Selbst nach 3minütigem Erhitzen auf 100°C war
 keine Aktivitätsabnahme feststellbar.

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob der HPI spezi-
 fisch für Trypsin ist, oder ob noch andere Enzyme durch ihn
 gehemmt werden. Fast alle der bisher bekannten Inhibitoren
 hemmen neben Trypsin auch Kallikreine, Chymotrypsin oder
 Plasmin.

Die Prüfung der Kallikrein-Hemmung (Pankreas-, Submaxillaris-, Serum- und Harn-Kallikrein vom Schwein) erfolgte mittels der BAEE-Methode. Auch hier wurden 0,5 ml BAEE pro Test eingesetzt, TRAP-Puffer (pH = 7,8) dazugegeben und mit 0,2 KE (Kallikreineinheiten) die Reaktion gestartet. Die Spaltung wurde während 15 Minuten gemessen.

Beim Testansatz wurden 0,2 KE mit einem großen Überschuß an Inaktivator vorinkubiert und die Reaktion durch BAEE-Zusatz gestartet. Es zeigte sich, daß der HPI weder Pankreas-, Submaxillaris-, Serum-, noch Harn-Kallikrein zu hemmen vermag.

Zur Bestimmung der Chymotrypsin-Hemmung eignet sich besonders gut das synthetische Substrat SUPHEPA (N-Succinyl-Phenylalanin-p-Nitroanilid) (nach WIOTINAS, Dissertation, München 1965). Da sich SUPHEPA schlecht in Wasser löst, wurde es in wenig Aceton gelöst. Die Methode entspricht im Prinzip der BAPA-Methode. Die Extinktionsänderung wird nach 20 Minuten abgelesen. Zum Chymotrypsin wurde ein Überschuß des Hunde-Pankreas-Inaktivators gegeben und die Spaltung verfolgt. Es zeigte sich, daß der HPI Chymotrypsin nicht zu hemmen vermag. Auch Plasmin, gemessen mit dem Substrat TAME (p-Tosyl-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid), wurde nicht gehemmt.

Zur Prüfung, ob der HPI imstande ist, auch Kathepsine zu hemmen, standen uns keine gereinigten Kathepsin-Präparate zur Verfügung. Daher wurde versucht, nach der Methode von ANSON (215) die Autolyse eines Kathepsin-reichen Organs durch einen großen HPI-Überschuß zu hemmen. Wir verwendeten ein Hunde-Nieren-Homogenat und verfolgten die Autolyse bei pH = 6 und 37°C während 6 Stunden. Während dieser Zeit war gegenüber dem

Vergleichsansatz keine Hemmung der Autolyse feststellbar, was bedeutet, daß der HPI Kathepsine nicht zu hemmen vermag.

Während der Autolyse war dagegen eine stetige Abnahme der Aktivität des zugefügten Inaktivators zu beobachten. Nach 6 Stunden ließ sich kein Inhibitor im Autolyse-Homogenat mehr nachweisen. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß der HPI von Kathepsinen zerstört wird.

Zur Prüfung, ob die pflanzliche Proteinase Papain vom HPI gehemmt wird, eignet sich die BAPA-Methode. Es wurde ein Papain der Firma Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey, verwendet. Das inaktive Papain wird durch einen Zusatz von Cystein ($0,165 \mu\text{Mol/ml}$) aktiviert. Da bei der Papainbestimmung Schwermetallionen störend wirken, werden diese durch einen Zusatz von $0,06138 \text{ mg/ml}$ Komplexon (Titriplex) abgefangen.

Bei einem Test wurden $0,67 \text{ mg}$ Papain eingesetzt, $0,1 \text{ ml}$ Titriplex, $0,1 \text{ ml}$ Cystein und $1,7 \text{ ml}$ $0,2\text{M}$ TRAP-Puffer ($\text{pH} = 6,5$). Zugesezt wurden steigende Inaktivatorkonzentrationen zwischen 50 und 100 TIE.

Es wurde gefunden, daß der HPI Papain stark hemmt, und zwar wurden $7,8 \mu\text{g}$ Papain von 1 TIE zur Hälfte inaktiviert, d.h. daß das Papain von HPI wesentlich stärker gehemmt wird als Trypsin.

Wichtig erschien weiterhin zu testen, ob das Phänomen einer temporären Hemmung vorliegt, wie bei dem von Kazal beschriebenen Rinder-Pankreas-Inaktivator, d.h. ob der Hemmstoff gleichzeitig Substrat für das Trypsin ist.

Zu diesem Zweck inkubierten wir eine bestimmte Menge Trypsin mit soviel Inaktivator, daß eine 50%ige Hemmung resultierte, bis zu 8 Stunden. Während dieser Zeit blieb das Hemmver-

hältnis konstant, was bedeutet, daß der Inaktivator nicht von Trypsin abgebaut wird. Die gleiche Beobachtung wurde bei Verwendung von Chymotrypsin gemacht, auch Chymotrypsin vermag den Inaktivator nicht abzubauen.

Auch Carboxypeptidase A, Collagenase, Plasmin und Papain vermögen den HPI nicht anzugreifen.

Die meisten Proteine und Polypeptide werden durch Pepsin mehr oder weniger schnell abgebaut. Auch der HPI wurde daraufhin untersucht. 10 TIE Inaktivator wurden mit 4 µg (0,1 ml) einer sauren Pepsinlösung (pH = 2) zusammengebracht und unterschiedliche Zeiten inkubiert. Danach wurde mit 0,2m TRAP-Puffer auf pH = 7,8 eingestellt, 0,1 ml (5 µg) Trypsin hinzugefügt und nach erneutem Inkubieren die Reaktion mit BAPA gestartet.

Es ergab sich, daß auch der HPI durch Pepsin abgebaut wird. Nach 5 Minuten Pepsineinwirkung waren 67%, nach 15 Minuten bereits 92% des Inhibitors zerstört.

Brachte man zunächst den Inaktivator mit Trypsin zusammen, so daß sich der Trypsin-Inaktivator-Komplex bilden konnte, und gab erst dann eine saure Pepsinlösung dazu, so fand man, daß der Komplex gegen eine peptische Verdauung gefeit ist.

Zu einer bestimmten Trypsinmenge wurde bei pH = 7,8 die doppelte Menge Inhibitor gegeben, die zur 100%igen Hemmung erforderlich war. Nach 5 Minuten Inkubation wurde auf pH = 2 eingestellt und Pepsin hinzugefügt. Nach weiteren 20 Minuten Inkubieren wurde die Lösung mit TRAP-Puffer auf pH = 7,8 gebracht und die gleiche Trypsinmenge noch einmal hinzugefügt, anschließend wurde mit BAPA gestartet. Die Extinktionsänderung entsprach genau der Aktivität des zuletzt eingesetzten Trypsins.

Dieses Ergebnis zeigt besonders anschaulich, daß nur der freie

Inaktivator von Pepsin zerstört wird, (nur die Hälfte des zugegebenen Inaktivators war an der Komplexbildung beteiligt, die restlichen 50% wurden zerstört) und daß der Komplex selbst bei $\text{pH} = 2$ stabil ist. Wäre er in seine Komponenten dissoziiert, so wäre der frei gewordene Inhibitor vom Pepsin zerstört worden und die Endextinktion wäre, bedingt durch das ebenfalls frei gewordene Trypsin, größer gewesen. (Das Trypsin selbst wurde in einem Leeransatz während der Versuchszeit von Pepsin nicht angegriffen).

In einem weiteren Versuch zeigte sich, daß auch die Enteropeptidase den HPI nicht zerstört.

Elektrophoretische Messungen mit verschiedenen Puffern von unterschiedlichem pH-Wert ($\text{pH} = 4 - 12,5$) ergaben, daß der HPI ein extrem basisches Polypeptid ist. Der IEP beider aktiver Komponenten liegt jenseits von $\text{pH} = 12,5$.

Eine Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration nach der Methode von J. PORATH (nicht veröffentlichte Daten) und WIELAND et al. (214) ergab ein Molekulargewicht von 7400.

Ein Dialyse-Versuch fiel positiv aus, der HPI ist langsam dialysabel.

Von besonderer Wichtigkeit erschien die Frage, ob der HPI die Autolyse des Pankreas zu hemmen oder gar abzustoppen vermag.

Ein Hunde-Pankreas-Homogenat wurde mit so viel HPI versetzt, daß dem maximal freisetzbaren Trypsin ein Überschuß an Inaktivator gegenüberstand. Bei physiologischem pH und 37°C wurde die Autolyse während 6 Stunden verfolgt und nach der Methode von ANSON gemessen.

Während dieser Zeit war keine Hemmung der Autolyse zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

Der HPI ist ein extrem basisches Polypeptid mit einem IEP über 12,5 für beide aktive Komponenten und einem Molekulargewicht von 7400. Außer Trypsin hemmt er nur Papain, nicht dagegen Kallikreine, Chymotrypsin, Plasmin und Kathepsine. Der HPI wird weder von Trypsin noch Chymotrypsin abgebaut, auch nicht von Carboxypeptidase A, Collagenase, Plasmin, Papain und Enteropeptidase. Von Pepsin und Kathepsinen wird der HPI irreversibel zerstört.

Der HPI ist sehr säure- und hitzelabil, wird aber im Alkalischen langsam zerstört. In Form eines Trockenpulvers, aber auch in Lösung ist er über lange Zeit stabil. Er ist langsam dialysierbar.

Die Autolyse des Pankreas wird durch den HPI nicht gehemmt.

D. Diskussion.

I. Abgrenzung des HPI gegen andere Trypsin-Inaktivatoren.

A. Pflanzliche Inhibitoren.

Gegen die bisher bekannten Inaktivatoren pflanzlichen Ursprungs lässt sich der HPI relativ leicht abgrenzen, schon allein durch das meist höhere Molekulargewicht der pflanzlichen Inhibitoren. So hat der

- 1.) SBI ein Molekulargewicht von 20 000. Außerdem hemmt er Chymotrypsin, Plasmin und Serum-Kallikrein. Er ist hitze- und säurelabil.
- 2.) Der Lima-Bohnen-Inaktivator hat ein Molekulargewicht von 10 000.
- 3.) Der Hemmstoff aus Bohnen, Erbsen und Linsen hemmt auch Chymotrypsin.
- 4.) Der Kartoffel-Inhibitor hemmt Chymotrypsin, Pepsin und

Kallikrein.

- 5.) Auch der von uns beschriebene Inaktivator aus Runkelrüben hemmt Chymotrypsin und Kallikreine. Außerdem ist er säure- und hitzelabil.

Wichtiger erscheint die Abgrenzung gegen Inaktivatoren aus tierischem Gewebe, besonders ein Vergleich mit den bisher beschriebenen Pankreas-Inhibitoren.

B. Tierische Inaktivatoren.

- 1.) Der Inhibitor aus Ascaris hemmt Pepsin und Kallikreine.
- 2.) Der Rinder-Parotis-Inaktivator (Trasylol) und weitere Inhibitoren aus Organen vom Rind sind dem HPI ähnlich, sind säure- und hitzestabil, haben ein Molekulargewicht um 6500, hemmen aber im Gegensatz zum HPI auch Chymotrypsin und Kallikreine.
- 3.) Die Inaktivatoren aus Vogeleiweiß hemmen zum großen Teil auch Chymotrypsin und Blutplasma-Kallikrein.
- 4.) Der Colostrum-Inaktivator hat ein Molekulargewicht von 10 500 und hemmt Chymotrypsin und Kallikreine.
- 5.) Der Blutplasma-Inhibitor ist säure- und hitzelabil, ist elektrophoretisch heterogen, hemmt Chymotrypsin, aber nicht Kallikreine.
- 6.) Der Harn-Inhibitor ist ein extrem saures Polypeptid, hat ein Molekulargewicht von 30 000 und hemmt Chymotrypsin.
- 7.) Der STI (Submaxillaris-Trypsin-Inhibitor) hat ähnliche Eigenschaften wie der HPI, hemmt jedoch auch Chymotrypsin.
- 8.) Besonders interessant ist die Tatsache, daß die bisher beschriebenen Pankreas-Inaktivatoren nicht mit dem Pan-

kreas-Inaktivator vom Hund identisch sind.

Der von Kunitz beschriebene Inhibitor aus Rinder-Pankreas hemmt im Gegensatz zum HPI auch Chymotrypsin und Kallikreine. Er hat einen IEP von 10. Außerdem ist für ihn besonders charakteristisch, daß er nicht von Pepsin verdaut wird, im Gegensatz zu allen bisher bekannten Inhibitoren.

9.) Der von Kazal beschriebene Inhibitor, ebenfalls aus Rinder-Pankreas, läßt sich elektrophoretisch in drei Zonen trennen, von denen mindestens zwei aktiv sind. Es wurden für sie isoelektrische Punkte von 4,8 , 5,2 und 5,9 gefunden. Der Kazal'sche Inaktivator zeigt das Phänomen der "temporary inhibition", wird also von Trypsin und Chymotrypsin abgebaut. Er wird durch 5 - 10%ige TES gefällt und ist nicht dialysabel.

10.) Der Inaktivator aus Kaninchen-Pankreas hemmt auch Chymotrypsin.

11.) Der Inhibitor aus Ratten-Pankreas-Saft hemmt zwar Chymotrypsin nicht, soll aber wie der Kazal'sche Inaktivator von Trypsin und Chymotrypsin abgebaut werden.

Bei diesem Vergleich ergibt sich, daß HPI ein neuer Inaktivator ist, mit Eigenschaften, durch die er sich von allen bisher beschriebenen Inaktivatoren abgrenzen läßt.

Die Ähnlichkeit mit dem Inaktivator aus Schweine-Pankreas, dem aus menschlichen Pankreas und einem weiteren Inaktivator aus Rinder-Pankreas, der verschieden ist von den Rinder-Pankreas-Inaktivatoren, die von Kunitz und Kazal beschrieben wurden, ist unverkennbar.

Diese drei Inaktivatoren, die zur Zeit in unserem Arbeits-

kreis isoliert und charakterisiert werden (vgl. dazu auch Dissertation F. WOITINAS, München 1965) hemmen wie der HPI Chymotrypsin und Kallikrein nicht, auch weisen sie in ihrem Verhalten gegenüber Säure, Alkali und Hitze keine Unterschiede zum HPI auf.

Ein exakter Vergleich ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Nach KASSELL und LASKOWSKI (202) ist eine Abgrenzung der Inhibitoren gegeneinander auch möglich auf Grund ihrer unterschiedlichen Resistenz gegenüber Pepsin wie die folgende Tabelle zeigt, in die noch der HPI eingeordnet ist:

Inaktivator Zeit, in der 50% durch Effekt von Säure allein Pepsin verdaut sind

Blutplasma	30 Sekunden	inaktiv in als 30 Sek.
Ovomucoid	135 Minuten	voll aktiv nach 2 Std.
SBI	44 Minuten	50% in 1 Std. denatur.
Colostrum	183 Minuten	stabil in Säure
Kazal I.	5 Minuten	voll aktiv nach 40 Min.
Kunitz I.	3 Wochen	stabil in Säure
HPI	3 Minuten	stabil in Säure

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß der HPI besonders anfällig ist gegen peptische Verdauung. In dieser Beziehung steht ihm der Kazal'sche Inaktivator am nächsten.

In der folgenden Übersichtstabelle sind noch einmal die wichtigsten Eigenschaften der Trypsin-Inhibitoren zusammengestellt, die eine Abgrenzung gegen den HPI ermöglichen:

Inaktivator	säure-hitze- stabil	Hemmung von Chymo. Kallikr.	Zerstörung durch Pepsin/Tryp.+Chymo.		
SBI	-	+	+	+	-
Erbsen etc.	+	+	+	?	-
Kartoffel	-	+	+	+	-
Runkelrüben	-	+	+	+	-
Ascaris	+	+	+	-	-
Trasylol	+	+	+	-	-
Ovomucoid	+	+	+	+	+
Colostrum	+	+	+	+	-
Blutplasma	-	+	-	+	-
Harn-I.	<u>+</u>	+	-	+	-
STI	+	+	-	+	-
Kunitz	+	+	+	-	-
Kazal	+	-	?	+	+
HPI	+	-	-	+	-

II. Kritische Auseinandersetzung mit den Ergebnissen anderer Autoren.

Mit dem von uns entwickelten Verfahren ist es erstmals gelungen, reinen Trypsin-Inaktivator aus Hunde-Pankreas zu isolieren. Wir konnten deshalb seine Eigenschaften eingehend untersuchen, ohne eine Beeinträchtigung durch den hohen

Fremdeiweißgehalt der Rohpräparate befürchten zu müssen.

Bei der Beschreibung des Hunde-Pankreas-Inaktivators haben manche Autoren Eigenschaften angegeben, die sich nach Reinigung des Präparates nicht bestätigen ließen.

So fand GROSSMAN (205), daß der HPI wie der Kazal'sche Inhibitor von Trypsin und Chymotrypsin zerstört wird. Dieser Effekt wurde aus der Aktivitätszunahme des Trypsins bei zweistündigem Inkubieren geschlossen.

Es wurde zur Untersuchung ein Lyophilisat verwendet, das mit einer 2,4%igen TES enteivweiß worden war. Wir haben aber festgestellt, daß durch alleinige Verwendung von Säure das Trypsinogen zwar weitgehend, jedoch nicht quantitativ ausgeschaltet wird. So ist es denkbar, daß während der zweistündigen Inkubation Reste von Trypsinogen zu Trypsin aktiviert wurden, das den Inhibitor durch Komplexbildung abfing und somit einen Abbau des Inaktivators vortäuschte.

Nach KALSER und GROSSMAN (210) ist der HPI mit großer Wahrscheinlichkeit mit dem Kunitz'schen Inaktivator identisch.

Es steht aber nunmehr fest, daß sie verschieden sind.

Nach GROSSMAN können pro Gramm Pankreasgewebe 102 μ g Trypsin gehemmt werden. Nach unseren Ergebnissen enthält jedoch das Hundepankreas pro Gramm Gewebe 400 TIE, d.h. es können pro Gramm 200 μ g Trypsin gehemmt werden.

Bei Verwendung von Rohpräparaten wurde gefunden (5), daß der HPI in geringem Maße auch Kallikreine hemmt, ein Befund, der nicht bestätigt werden konnte. Nach der Enteivweißung fände sich nurmehr eine Inhibitor-Kapazität von 20% der ursprünglichen, die überwiegende Hemmkapazität stamme also von einem hochmolekularen Inhibitor. Auch nach TRAUTSCHOLD (61) werden mindestens zwei trypsinhemmende Prinzipien unterschieden:

1.) der als "freier" Inhibitor bezeichnete von 800 KIE/g (seiner Hemmung von 1,2 mg Trypsin zu 50%).

2.) der säurestabile Inaktivator, der Trypsin und Kallikrein zu hemmen vermag (80 KIE/g).

Diese Befunde konnten von uns nun nicht bestätigt werden. Sowohl vor der Enteiweißung als auch nachher fand sich eine konstante Menge Inaktivator von 400 TIE/g Pankreas. Es wurde nur ein niedermolekularer Inaktivator gefunden, nicht aber zusätzlich ein hochmolekularer. Eine Kallikrein-Hemmung war nicht feststellbar. Die entsprechende Trypsin-Hemmung ist um das Dreifache zu hoch angegeben.

Es wurde angegeben (5), daß im Pankreas-Sekret etwa der zehnte Teil des in ihm maximal aktivierbaren Trypsinogens vom vorhandenen Inaktivator gehemmt werden kann.

Nach unseren Ergebnissen ist dieses Verhältnis aber viel ungünstiger. Nur ein Hundertstel des insgesamt vorhandenen aus Trypsinogen freisetzbaren Trypsins kann nach seiner Aktivierung gehemmt werden.

Wenn das Pankreas-Sekret das Gangsystem verläßt und in das Duodenum übertritt, hat der Inaktivator seine Aufgabe erfüllt. Es wäre nun kein Luxus, wenn nach der Aktivierung des Trypsinogens ein kleiner Teil des Trypsins gehemmt würde und damit für seine Aufgabe verloren wäre; denn wie ausgeführt werden konnte, kann nur ein Hundertstel des maximal aktivierbaren Trypsins vom eigenen Inaktivator gehemmt werden.

Trotzdem hält der Organismus in der Darmschleimhaut einen Stoff bereit, der den Inaktivator bei seinem Eintritt in das Duodenum zerstört (210, 211). Dieser Stoff, wahrscheinlich

ein Enzym, ist bisher noch nicht identifiziert worden.

Jedenfalls ist er nach MARS et al. (212) nicht mit Enteropeptidase identisch, wie von BERNARD et al. (211) behauptet wurde. Auch nach unseren Untersuchungen ist gereinigte Enteropeptidase nicht imstande, den Inaktivator zu zerstören.

KALSER und GROSSMAN (210) fanden in einigen Proben frisch gewonnenen Hunde-Pankreas-Saftes neben dem Inaktivator eine kleine Menge proteolytischer Aktivität. Diese proteolytische Aktivität, die auch andere Autoren beschrieben haben, kann natürlich nicht durch freies Trypsin verursacht sein, wie jene annahmen, da aktives Trypsin und freier Inaktivator sofort einen inaktiven Komplex bilden.

Bei unseren Messungen wurde eine spontane proteolytische Aktivität allerdings nur im Homogenat gefunden, nicht im Saft. Einen Anstieg dieser spontanen proteolytischen Aktivität fanden KALSER und GROSSMAN (213) bei der experimentellen Pankreatitis, sowohl im Saft als auch im Homogenat, Befunde, die für das Homogenat von uns bestätigt werden konnten.

Eine mögliche Bedeutung dieser noch nicht näher charakterisierten Proteasen bei der Entstehung der akuten Pankreas-Nekrose ist bis heute nicht berücksichtigt worden, wird in unserem Labor jedoch für möglich gehalten.

III. Kritische Betrachtungen zur Theorie der tryptischen Pankreatitis.

Im Hinblick auf das Pankreatitis-Geschehen war es ein besonders überraschender Befund, daß der HPI als Trypsin-spezifischer Inhibitor nicht imstande ist, die Autolyse des Pankreas hemmend zu beeinflussen; denn wie eingangs geschildert

wird bisher die akute Pankreas-Nekrose mit einer tryptischen Selbstverdauung erklärt. Zwar weiß man schon seit einiger Zeit, daß in einem Homogenat während der Autolyse zu keinem Zeitpunkt freies Trypsin nachgewiesen werden kann, daß aber gleichzeitig die vorhandene Trypsinogenmenge und der Inaktivatorgehalt abnehmen. Daraus schloß man, daß während der Inkubation des Homogenats freies Trypsin entsteht, welches seine proteolytische Wirkung ausüben kann, bevor es vom Inaktivator abgefangen wird.

Nun konnte aber selbst mit einem großen Überschuß eines Trypsin-spezifischen Inaktivators keine Hemmung der Autolyse erzielt werden. Das legt den Verdacht nahe, daß die zentrale Stellung, die man dem Trypsin bei der Autolyse des Pankreas eingeräumt hat, nicht zu Recht besteht; denn es ist unwahrscheinlich, daß etwaig entstehendes freies Trypsin zur Wirkung kommen kann, wenn diesem Trypsin eine große Menge Inaktivator gegenübersteht, der mit dem Trypsin sofort einen inaktiven Komplex bildet.

Nun ist das Pankreas das einzige Organ, an dem es zu einem so foudroyant verlaufenden autolytischen Geschehen kommt, wie es bei der akuten Pankreas-Nekrose beobachtet wird. Es ist naheliegend, den großen Reichtum an Enzymen dafür verantwortlich zu machen. Da das Trypsinogen physiologischerweise zuerst aktiviert wird, und das freigesetzte Trypsin seinerseits fast alle anderen Proenzyme zu aktivieren vermag, lag es nahe, auch bei der akuten Pankreatitis an eine Trypsinfreisetzung als auslösenden Faktor zu denken. Diese Theorie wird durch unsere Ergebnisse nicht gestützt; denn die Trypsin-Theorie bestände nur dann zu Recht, wenn die Autolyse zum Stillstand käme oder deutlich verzögert würde,

nachdem eine Freisetzung von aktivem Trypsin verhindert wurde.

In diesem Zusammenhang ist interessant, daß wir mit dem STI (Submaxillaris-Trypsin-Inaktivator) eine 40%ige Hemmung der Pankreas-Autolyse erreichen konnten. Der STI hat ähnliche Eigenschaften wie der HPI, jedoch hemmt er außer Trypsin auch Chymotrypsin. Da auch Trasylol, das neben Trypsin ebenfalls Chymotrypsin zu hemmen vermag, die Pankreas-Autolyse bis zu einem gewissen Grade zu verlangsamen imstande ist, (WERLE et al.), könnte an eine größere Bedeutung des Chymotrypsinogen durch ein bisher nicht beschriebenes Enzym aktiviert wird.

Jedoch müssen auch Kathepsine diskutiert werden, die nach unseren Messungen den Trypsin-Inaktivator abbauen können. Auch Trypsinogen wird von Kathepsinen unspezifisch zerstört, ohne daß es zu einer Freisetzung von aktivem Trypsin kommt. Dies geht daraus hervor, daß Trypsinogen, das einem Nierenhomogenat zugesetzt wurde, nach einer 6stündigen Autolyse verschwunden war, ohne intermediäre Bildung von aktivem Trypsin (gemessen nach Enteropeptidase-Aktivierung nach der BAPA-Methode).

Es ist denkbar, daß die Trypsinogen- und Inhibitor-Abnahme bei der Pankreas-Autolyse bisher falsch interpretiert wurde, daß also die Abnahme nicht durch eine Freisetzung von Trypsin, sondern durch eine unspezifische Zerstörung hervorgerufen wird.

Zu einer endgültigen Klärung bedarf es weiterer Untersuchungen. Die Erprobung einer klinischen Anwendungsmöglichkeit des HPI ist aus den geschilderten Gründen wohl nicht indiziert,

obwohl der HPI dem menschlichen Pankreas-Inaktivator weit ähnlicher ist als das Trasylol, wahrscheinlich sogar mit dem menschlichen Inaktivator identisch, also physiologischer wäre.

Die Frage, warum es in Bauchspeicheldrüsen von Tier und Mensch überhaupt Trypsin-Inaktivatoren gibt, ist bisher immer nur aus teleologischer Sicht beantwortet worden, eine Betrachtungsweise, die zu einseitig ist. Die Befunde, daß einer maximal aktivierbaren Trypsinogenmenge nur eine geringe Menge an Inaktivator gegenübersteht, daß weder in gesundem noch akut entzündlichem Pankreas zu keinem Zeitpunkt freies Trypsin nachgewiesen kann, daß ein spezifischer Inaktivator für Trypsin selbst in großem Überschuß die Autolyse des Organs nicht zu hemmen vermag, lassen daran denken, daß den Pankreas-Trypsin-Inaktivatoren im Stoffwechsel möglicherweise eine andere, bisher unbekannte Aufgabe zufällt.

Es wäre denkbar, daß die Trypsin hemmende Eigenschaft dieser Stoffe ein Zufallsbefund ist, und daß sie funktionell eine andere Rolle spielen.

3. Zusammenfassung.

- 1.) Es wurde ein kurzer Überblick über die bisher bekannten Trypsin-Inaktivatoren aus pflanzlichen und tierischen Geweben gegeben. Ihre Eigenschaften wurden beschrieben.
- 2.) Ein neuer pflanzlicher Inhibitor in Runkelrüben wurde angereichert und hinsichtlich seiner Eigenschaften charakterisiert.
- 3.) Die Trypsinaktivitätsbestimmung mit Hilfe des synthetischen Substrats BAPA war infolge ihrer hohen Empfind-

lichkeit und raschen Durchführbarkeit allen anderen Methoden zur Inaktivatorbestimmung überlegen und lieferte auch in Extrakten mit hohem Fremdeiweißgehalt reproduzierbare Ergebnisse.

- 4.) Es wurde ein allgemein anwendbares Verfahren beschrieben, das es uns erstmals ermöglichte, aus Hunde-Pankreas den Trypsin-Inaktivator (HPI) mit nur geringem Arbeitsaufwand und in hoher Ausbeute zu isolieren.
- 5.) Die Feinreinigung des Inaktivators gelingt in einfacher Weise über seinen Komplex mit Trypsin durch Sephadex-Gelfiltration.
- 6.) Mit Hilfe der Acetatfolien-Elektrophorese wurde der reine Inaktivator präparativ in drei Proteinfractionen getrennt, von denen zwei aktiv waren. Ihre endständigen Aminosäuren (Glutaminsäure oder Asparaginsäure und Threonin) wurden nach der Methode von SANGER bestimmt. Das Molekulargewicht des Inaktivators konnte durch Sephadex-Gelfiltration ermittelt werden (Molekulargewicht = 7400).
- 7.) Der gleiche Trypsin-Inaktivator wurde auch im Pankreas-Sekret des Hundes gefunden.
- 8.) Die Eigenschaften des neuen Inaktivators hinsichtlich seiner Hemmfähigkeit gegenüber anderen proteolytischen Enzymen bzw. Zerstörbarkeit durch diese wurden untersucht. Dabei ergab sich, daß der HPI nur Trypsin und Papain zu hemmen vermag und durch Pepsin und Kathepsine zerstört wird.
- 9.) Der HPI unterscheidet sich von allen bisher beschriebenen Trypsin-Inaktivatoren. Er zeigte jedoch große Ähnlichkeit mit den Trypsin-Inaktivatoren aus Bauchspeicheldrüsen von Mensch und Schwein, ist aber verschieden von Inhibitoren

aus Rinderorganen(Kunitz-Inhibitor, Kazal-Inhibitor, Trasylol, etc.)

10.) Die Autolyse des Pankreas ist durch den HPI, einen Trypsin-spezifischen Hemmstoff, nicht hemmbar.

Diese Tatsache wurde im Zusammenhang mit Problemen der Pankreatitis diskutiert.

F. Literaturverzeichnis

1. HAVERBACK, B.J., DYCE, B., BUNDY, H. and H.A. EDMONDSON:
Amer. J. Med. 29, 424 (1960).
2. BECKER, V.: Gastroenterologia 94, 65 (1960).
3. ZICKGRAF, G.: unveröffentlicht.
4. POPPER, H.L., NECHELES, H. and K.C. RUSSELL:
Surg. Gyn. and Obstr. 87, 79 (1948).
5. WERLE, E., TRAUTSCHOLD, I., SEBENING, H. und H. FRITZ:
Kongress für Gastroenterologie, Wiesbaden,
April 1964.
6. WILLSTÄTTER, R. und RHODEWALD:
J. physiol. Chem. 218, 77 (1933)
7. HOKIN, L.E.: Biochim. Biophys. Acta 18, 379 (1955).
8. TRAUTSCHOLD, I.:
Diskussionsbemerkung. Europ. Pankr. Semp.
Erlangen 1963, Schattauer Stuttgart, S. 189.
9. NEURATH, H. and G.W. SCHWERT:
Chem. Rev. 46, 69 (1950).
10. NORTHROP, J.H., KUNITZ, M. and R.M. HERRIOTT:
Crystalline enzymes, Ed 2, Columbia University Press, New York, S. 153 (1948).
11. LASKOWSKI, M., LASKOWSKI, M. jr., ANSON, M.L., BAILLY, K.
and J.T. EDSAL:
Advances in protein chemistry IX, 203 (1954).
12. VOGEL, R.: unveröffentlicht.
13. TAUBER, H., KRESHAW, B.B. and R.D. WRIGHT:
J. Biol. Chem. 197, 1155 (1949).
14. GREEN, N.M.: J. Biol. Chem. 205, 535 (1953).
15. KUNITZ, M.: J. Gen. Physiol. 30, 291 (1947).
16. GREEN, N.M. and E. WORK: Biochem. J. 54, 257 (1953).
17. FRAENKEL-CONRAT, H., BEAN, R.C., DUCAY, E.D. and H.S. OLCOTT:
Arch. Biochem. Biophys. 37, 393 (1952).
18. LEWIS, J.C., SNELL, N.S., HIRSCHMANN, D.J. and H. FRAENKEL-CONRAT:
J. Biol. Chem. 186, 23 (1950).
19. SRI SAM, J., TERMINIELLO, L., BIER, M. and F.F. NORD:
Arch. Biochem. Biophys. 52, 451 (1954).
20. WU, F.C. and M. LASKOWSKI:
Fed. Proc. 13, 326 (1954).
21. KUNITZ, M.: J. Gen. Physiol. 30, 311 (1947).

22. LASKOWSKI, M. and F.C. WU:
J. Biol. Chem. 204, 797 (1953).
23. LASKOWSKI, M. in Methods in Enzymology (Colowick and Kaplan Eds) II.
24. GREEN, N.M. and E. WORK:
Biochem. J. 54, 347 (1953).
25. BORCHERS, R., ACKERSON, C.W. and L. KIMMETT:
Arch. Biochem. 12, 367 (1947).
26. FRAENKEL-CONRAT, H., BEAN, R.C. and H. LINEWAEVER:
J. Biol. Chem. 177, 385 (1949).
27. DESNUELLE, P.:
Boyer Lardy Myrback, The Enzymes IV 1960.
28. McLAREN, A.D.:
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. Chim.,
28, No. 3, 175 (1952).
29. SCHWERT, G.W. und M.A. EISENBERG:
J. Biol. Chem. 179, 665 (1949).
30. SMITH, E.L., BROWN, D.M. and M. LASKOWSKI:
J. Biol. Chem. 191, 639 (1951).
31. JENSEN, H., CHAMOVITZ, D.L., VOLKRINGER, E., GRAY, E.,
GROSNAY, J.E. and W. KOCHOLATY:
Blood 8, 324 (1952).
32. KOCHOLATY, W., ELLIS, W.W. and H. JENSEN:
Blood 7, 882 (1952).
33. KOCHOLATY, W., ELLIS, W.W. and H. JENSEN:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 80, 36 (1952)
34. WESTPHAL, U., KOCHOLATY, W., McDONALD, B., KING, E. and
H. JENSEN: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 75, 862 (1950).
35. MIRSKY, J.A.: Science 100, 198 (1944).
36. FERGUSON, J.H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 51, 373
(1942).
37. BALLONN, S.L. and E.L. JOHNSON:
Arch. Biochem. Biophys. 42, 355 (1953).
38. LEWIS, J.H. and J.H. FERGUSON:
J. Biol. Chem. 204, 503 (1953)
39. FERGUSON, J.H. TRAVIS, B.L. and E.B. GERHEIM:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 64, 302 (1947).
40. GLAZKO, A.J.: J. Clin. Invest. 26, 364 (1947).
41. GLENDENING, M.B. and E.W. PAGE:
J. Clin. Invest. 30, 1298 (1951)

42. Mac FARLANE, R.G.:
J. Physiol. 106, 104 (1947).
43. MIHALYI, E.: J. Gen. Physiol. 37, 139 (1953).
44. TAGNON, H.J. and J.P. SOULIER:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 61, 440 (1946).
45. MANSFELD, V., ZIEGELHÖFFER, A., HOVÁKOVÁ, Z. and J. HLADOVEC:
Nature, 46, 172 (1959).
46. VOGEL, R.: Persönliche Mitteilungen.
47. BORCHERS, R. and C.W. ACKERSON: Arch. Biochem. 13, 291 (1947).
48. HAM, W.E. and R.M. SANDSTEDT:
J. Biol. Chem. 154, 505 (1944).
49. BOWMAN, D.E.:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 57, 139 (1944).
50. SMITH, A.K., SCHUBERT, E.N. and P.A. BELTER:
J. Amer. Oil Chemist's Soc. 32, 274 (1955).
51. KUNITZ, M.: Science 101, 668 (1945).
52. KUNITZ, M.: J. Gen. Physiol. 29, 149 (1946).
53. RACKIS, J.J., SASAME, H.A., MANN, R.K., ANDERSON, R.L. and A.K. SMITH: Arch. Biochem. Biophys. 98, 471 (1962).
54. RACKIS, J.J., SASAME, H.A., ANDERSON, R.L. and A.K. SMITH: J. Amer. Chem. Soc. 81, 6265 (1959).
55. RACKIS, J.J. and R.L. ANDERSON:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 230 (1964).
56. STURTEVANT, J.M.: Personal Communication 1954.
57. GREEN, N.M. and E. WORK:
Biol. J. 54, 347 (1953).
58. MARKUS, G. and W.C. WERKHEISER:
Fed. Proc. 21, 64 (1962).
59. MANSFELD, V., RYBAK, M., HOVÁKOVÁ, Z. and J. HLADOVEC:
Hoppe-Seyler-Thierfelder 318, 6 (1960).
60. WERLE, E.: 27. Tagung d. dt. pharmakol. Ges. Wien, Sept. 1962.
61. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E., HAENDLE, H. and H. SEBENING:
Europ. Pankr. Symp. Erlangen 1963 Schattauer Stuttgart, S. 289.
62. BHOOIA, K.D., CELLE, J.D. and M. SCHACHTER:
J. Physiol. 152, 75 (1960).
63. MARTIN, C.J. and AXELROD, A.E.:
Biochim. Biophys. Acta 26, 490 (1957).

64. MILL, P.J., ELDER, M., MILES, A.A. and D.L. WILHELM:
Brit..J. Exp. Path. 39, 343 (1958).
65. GREEN, N.M.: Biochem. J. 66, 416 (1957).
66. ERDÖS, E.G. and SLOANE, E.M.:
Biochem. Pharmacol. 11, 585 (1962).
67. BIRK, Y.: Int. Kongress Moskau, 1961, S. 100.
68. WERLE, E. und B. KAUFMANN-BRETSCH, B.:
Z. Physiol. Chem. 319, 52 (1960).
69. WERLE, E. und R. VOGEL:
Arch. Int. Pharmacodyn. 126, 171 (1960).
70. GREEN, N.M. and H. NEURATH: "The Proteins" von Neurath, H.
and K. BAILEY:
Academic Press, New York (1953 - 1954).
71. LIENER, J.E.: J. Nutr. 49, 527 (1953).
72. HAYNES, P.C. and R.L. LYMAN: J. Nutr. 74, 445 (1961).
73. AUDREENKO, G.V. and B.A. KUDRYASHOV:
Voprory Med. Klin. 7, 70 (1961).
74. BIRK, Y. and A. GERTLER:
J. Nutr. 75, 379 (1961)
75. KAZMERS, N.: Vortrag b. IV. Ann. Clin. Congress of
Abdominal Surgeons, New York 1963.
76. BARNES, R.H., FIALA, G. and G. KWONG:
J. Nutr. 77, 278 (1962).
77. LYMAN, R.L. and S. LEPKOVSKY: J. Nutr. 62, 269 (1957).
78. HLADOVEC, J., MANSFELD, V. and HORÁKOVÁ, Z.:
Naturwissenschaften 45, 575 (1958).
79. APPLGARTH, A., FURUTA, F. and S. LEPKOVSKY:
Poultry Sci. 43, 733 (1964).
80. ARSCOTT, P.M., KOPPE, J.L. and J.H. OLWIN:
Nature, 183, 753 (1959).
81. TAUBER, H., KRESHAW, B.B. and R.D. WRIGHT:
J. Biol. Chem. 197, 1155 (1949).
82. FRAENKEL-CONRAT, H.L., BEAN, R.C., DUCAY, E.D. and
H.S. OLCOTT: Arch. Biochem. Biophys. 37, 393
(1952).
83. JIRGENSONS, B., IKENAKA, T. and V. GORGURAKI:
Makromol. Chem. 39, 149 (1960).
84. JONES, G., MOORE, S. and W.H. STEIN:
Biochemistry 2, 66 (1963) .

85. RAMIREZ, J.S. and H.L. MITCHELL:
J. Agr. Food Chem. 8, 393 (1960).
86. BEAVCHENE, R.E. and H.L. MITCHELL:
J. Agr. Food Chem. 3, 762 (1957).
87. ASTRUP, T., BRAKMAN, P. and K.E. SJOLIN:
Nature 194, 980 (1962).
88. ASTRUP, T., BRAKMAN, P. and J. RASMUSSEN:
Thromb. Diath. Haem. 5, 329 (1960).
89. NILSSON, I.M.: Näringsforskning (Sweden) 4, 66 (1960).
90. HARMS, R.H., SIMPSON, C.F. and P.W. WALDROUP:
J. Nutr. 75, 127 (1961).
91. LEARMONTH, E.M.: J. Sci. Food Agric. 9, 269 (1958).
92. AMBE, K.S. and K. SOHONIE:
Experientia 12, 302 (1956).
93. LEARMONTH, E.M. and J.C. WOOD:
Chem. and Ind. (London) 51, 1569 (1960).
94. HONAVAR, P.M. and K. SOHONIE:
J. Univ. Bombay 24B, 64 (1955).
95. SOHONIE, K.S. and K.S. AMBE:
Experientia 12, 302 (1956).
96. WERLE, E. APPEL, W. und E. HAPPE:
Z. Vit. Horm. Fenn. Forsch. 10, 127 (1959).
97. WERLE, E. und L. MAIER: Biochem. Z. 322, 414 (1952).
98. WERLE, E., MAIER, L. und F. LÖFFLER:
Biochem. Z. 321, 372 (1951).
99. WERLE, E., MAIER, L. und E. RINGELMANN:
Naturwissenschaften 39, 328 (1952).
100. DeEDS, F., RYAN, C.A. and A.K. BALLS:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 772 (1964).
101. HLADOVEC, J., HOVÁKOVÁ, Z. and V. MANSFELD:
Arzneimittelforschung 11, 104 (1961).
102. SOLYOM, A., BOOSY, J. and P. TOLNAY:
Biochem. Pharmacol. 13, 391 (1964).
103. HLADOVEC, J., HOVÁKOVÁ, Z. and V. MANSFELD:
Arch. Int. Pharmacodyn. 128, 343 (1960).
104. WEINLAND, E.: Z. Biol. 44, 1 (1903).
105. MENDEL, L.B. and A.F. BLOOD:
J. Biol. Chem. 8, 177 (1910).
106. COLLIER, H.B.: Can. Res. J.19B, 91 (1941).
107. PEANASKY, R.J. and M. LASKOWSKI:
Biochim. Biophys. Acta 37, 167 (1960)

108. KRAUT, H., KÖRBEL, W., SCHOLTAN, W. und F. SCHULTZ:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 321, 90 (1960).
109. KRAUT, H. und KÖRBEL-ENKHARDT, R.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 309, 243 (1957).
110. KRAUT, H. und KÖRBEL-ENKHARDT, R.:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 312, 161 (1958).
111. KRAUT, H. und N. BHARGAVA: Vorläufiges Manuskript.
112. KRAUT, H., BHARGAVA, N., SCHULTZ, F. und H. ZIMMERMANN:
Z. Physiol. Chem. 334, 230 (1963).
113. SCHULTZ, F., KRAUT, H. und N. BHARGAVA:
Naturwissenschaften 50, 375 (1963).
114. FRITZ, H.: Persönliche Mitteilung.
115. WERLE, E. und L. MAIER:
Biochem. Z. 323, 279 (1952).
116. WERLE, E., GÖTZE, W. und A. KAPPLER:
Biochem. Z. 289, 217 (1937).
117. WERLE, E. und V. BEREK:
Biochem. Z. 320, 136 (1950).
118. WERLE, E., KEHL, R. und K. KOEBKE:
Biochem. Z. 320, 372 (1950).
119. WALFORD, R.L. and B. KICKHÖFEN:
Arch. Biochem. Biophys. 98, 191 (1962).
120. WERLE, E.: Langenbecks Arch. Klin. Chir. 303, 5 (1963).
121. HÖRMANN, H.: Persönliche Mitteilung.
122. KOSLOWSKI, L. und G. WASCHKEIT:
Klin. Wschr. 38, 1219 (1960).
123. KRAUT, H. und KÖRBEL-ENKHARDT, R.:
Leistungen u. Ergebnisse d. neuzeitl. Chirurgie
G. Thieme Verlag Stuttgart 1958, S. 62.
124. KRAUT, H. und N. BHARGAVA:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 334, 236 (1963).
125. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN:
Biochem. Z. 310, 384 (1942).
126. MÜLLER-WIELAND, K. (Hamburg-Eppendorf):
Dt. Z. Verdauungs- u. Stoffwechselkrankh. 21, 1
(1961).
127. WERLE, E. und W. APPEL:
Z. Naturforsch. 14b, 385 (1959).
128. SCHULTZ, F.: Diskussionsbemerkung zum Vortrag APPEL,
Europ. Pankr. Symp. Erlangen 1963, S. 318.
(Schattauer Verlag, Stuttgart).

129. ASTRUP, T. and A. STAGE:
Acta Chem. Scand. 10, 617 (1956).
130. ASTRUP, T. and O.K. ALBRECHTSEN: Scand. J. Clin. and
Lab. Invest. 9, 233 (1957).
131. SCHULTZ, F.: Deutsches Patent, auch Auslegungsschrift
1084433 (Anmeldetag 28.3.1959).
132. ASTRUP, T.: Acta Physiol. Scand. 26, 243 (1952).
133. ASTRUP, T.: Acta Haematol. (Basel) 7, 271 (1952).
134. ASTRUP, T.: 18th Int. Physiol. Congress Copenhagen
Abstracts 1950, S. 81.
135. APPEL, W. und E. WERLE:
Z. Naturforsch. 14b, 648 (1959).
136. WERLE, E. und W. APPEL:
Naturwissenschaften 45, 60 (1958).
137. DELEZENNE, C. and E. POZERSKI:
Compt. Rend. Soc. Biol. 55, 935 (1903).
138. GOMPEL, M. and V. HENRI:
Compt. Rend. Soc. Biol. 57, 457 (1905).
139. MEYER, K.: Adv. Prot. Chem. 2, 264 (1945).
140. FEVOLD, H.L.: Adv. Prot. Chem. 6, 188 (1951).
141. WARNER, R.C.: In "The Proteins" (NEURATH and BAILY, eds.)
Vol. II, Part A, pp. 435 - 484.
Academic Press, New York.
142. LASKOWSKI, M.: In "Methods in Enzymology" II, 36 (1955).
143. HARTLEY, F.K. and F.R. JERONS:
Biochem. J. 84, 134 (1962).
144. CHATTERJEE, A.K. and R. MONTGOMERY:
Arch. Biochem. Biophys. 99, 426 (1962).
145. FREDERICQ, E. and H.F. DEUTSCH:
J. Biol. Chem. 181, 499 (1949).
146. WU, F.C. and M. LASKOWSKI:
J. Biol. Chem. 213, 609 (1955).
147. FAARWANG, H.J. and P.J. KNUDSEN:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 108, 591 (1961).
148. WERLE, E., FORELL, M.M. und L. MAIER:
Naturwissenschaften 41, 89 (1954).
149. WEIL, L. and S.N. TIMASHEFF:
Arch. Biochem. Biophys. 87, 135 (1960).
150. STEVENS, J.C. and R.E. FEENEY:
Fed. Proc. 22, 529 (1963).

151. FEENEY, R.E., STEVENS, F.C., YVEH, M.H. and D.T. OSUGA:
Fed. Proc. 21, 232 (1962).
152. RHODES, M.B., BENNET, N. and R.E. FEENEY:
J. Biol. Chem. 235, 1686 (1960).
153. MARTIN, C.J. and AXELROD, A.E.:
Biochim. Biophys. Acta 27, 52 (1958).
154. UDAKA, K. und M. KONO:
Mie. Med. J. 10, 31 (1960).
155. UDAKA, K. und M. KONO:
Mie. Med. J. 10, 47 (1960).
156. KRAUT, H., FREY, E.K. und E. WERLE:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 192, 1 (1930).
157. WERLE, E., APPEL, W. und E. HAPP:
Arch. Exp. Path. und Pharm. 234, 364 (1958).
158. LASKOWSKI, M. jr., LASKOWSKI, M.:
Fed. Proc. 9, 194 (1950).
159. LASKOWSKI, M. jr., LASKOWSKI, M.:
J. Biol. Chem. 190, 563 (1951).
160. LASKOWSKI, M. jr., MARS, P.H. and M. LASKOWSKI:
J. Biol. Chem. 198, 745 (1952).
161. LASKOWSKI, M., KASELL, B. and G. HAGERTY:
Biochim. Biophys. Acta 24, 300 (1957).
162. LAMOY, L.: Compt. Rend. Soc. Biol. 81, 416 (1919).
163. SCHMITZ, A.: Z. Physiol. Chem. 255, 234 (1938).
164. FUJIMOTO, B.: J. Immunol. 3, 51 (1918).
165. CHRISTENSEN, L.R. and Mac LEOD, C.M.:
J. Gen. Physiol. 28, 559 (1944).
166. WEST, P.M. and J. HILLIARD:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 71, 169 (1949).
167. WEHR, H. and S. NIEWIAROWSKI:
Acta Physiol. Polonica 1-2, 141 (1953).
168. SHULMAN, N.R.: J. Exptl. Med. 95, 571 (1952).
169. SHULMAN, N.R.: J. Exptl. Med. 95, 593 (1952).
170. SHULMAN, N.R.: J. Exptl. Med. 95, 605 (1952).
171. LOOMIS, E.C., RYDER, A. and C.H. GEORGE:
Arch. Biochem. 20, 444 (1949).
172. HYANEK, J.: Cesk. Pedial. 18, 214 (1963).
173. SHULMAN, N.R.: J. Biochem. 213, 655 (1955).
174. ERICSON, S.: Acta Med. Scand. 175, 197 (1964).

175. TSITOURIS, G., BELLET, S., EILBERG, R., FEINBERG, L.
and H. SANDBERG: Arch. Intern. Med. 108, 208 (1961).
176. FAARVANG, H.J. and O.S. LAURITZEN:
Enzymol. Biol. Clin. 1, 189 (1962).
177. FAARVANG, H.J. and O.S. LAURITZEN:
Nature 199, 290 (1963).
178. SHULMAN, N.R.: Personal Communication 1953.
179. ASTRUP, T. and L. STERNDOERFF:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7, 239 (1955).
180. ASTRUP, T., ALKJAER, and F. SOARDI:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 11, 181 (1959).
181. WALDMANN-MEYER, H., NIELSEN, E. und T. ASTRUP:
Proc. VII. Congr. Europ. Soc. Haematol. Wien 1961
Karger (Basel) Nr. 456.
182. KNUTSEN, P.J. and J. KOEFOED: Scand. Med. J. Clin. Lab.
Invest. 13, (1961).
183. FREY, E.K., KRAUT, H. und E. WERLE: Stuttgart.
Ferdinand Enke 1950.
184. ASTRUP, T. and V. NISSEN:
Nature 203, 255 (1964).
185. HEDIN, S.G.: Z. Physiol. Chem. 52, 412 (1907).
186. LINEWEAVER, H. and C.W. MURRAY: J. Biol. Chem. 171, 565
(1947).
187. FAARVANG, H.J.: Acta Endocrinol. 30, 285 (1959).
188. FAARVANG, H.J.: Acta Endocrinol. 31, 117 (1959).
189. SAFARSYŃSLA-RYBKA, J.: Polki Tygod. Lekar und
Wiadomości Lekar 16, 604 (1961).
190. TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E., HAENDLE, H. und H. SEBENING:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 332, 328 (1963).
191. KUNITZ, M. und J.H. NORTHROP:
J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936).
192. Documenta Geigy (Wissenschaftl. Tab., 6. Aufl. Herausgeb.
J.R. Geigy AG. Pharm. Abt. Red. Konrad Diem).
193. SCROGGIE, A.E., JAKES, L.B. und M. ROCHE E SILVA:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 66, 326 (1947).
194. AVINERI, R., BLAVER, G. and M. RIGBI:
Israel J. Chem. 1, 199 (1963)
195. KASSELL, B., RADICEVIK, M. and M. LASKOWSKI:
Fed. Proc. 22. 529 (1963).

196. KASSELL, B., RADICEVIK, M., BERLOW, S., PLANASKY, R.J.
and M. LASKOWSKI, jr.: J. Biol. Chem. 238, 3274
(1963).
197. BANGA, J.: Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 24, 1 (1963).
198. LOEVEN, W.A.: Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 12 (3-4),
350 (1962).
199. LOEVEN, W.A.: Acta Physiol. Pharmacol. Neerl. 10, 228
(1962).
200. WEBSTER, M.E. and J.V. PIERCE: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.
107, 186 (1961).
201. WERLE, E.: Unveröffentlicht.
202. KASSELL, B. and M. LASKOWSKI:
J. Biol. Chem. 219, 203 (1956).
203. KAZAL, L.A., SPICER, D.S. and R.A. BRAHINSKY:
J. Amer. Chem. Soc. 70, 3034 (1948).
204. PEANASKY, R.J. and M. LASKOWSKI:
J. Biol. Chem. 204, 153 (1953).
205. GROSSMAN, M.J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 99, 304 (1958)
206. KALSER, M.H. and M.J. GROSSMAN:
Gastroenterology 29, 35 (1955).
207. GROSSMAN, M.J.: Fed. Proc. 17, 62 (1958).
208. KALSER, M.H. und M.J. GROSSMAN:
Fed. Proc. 11, 79 (1952).
209. ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N. and W. COHEN:
Arch. Biochem. Biophys. 95, 271 (1961).
210. KALSER, M.H. and M.J. GROSSMAN:
Gastroenterology 29, 35 (1955).
211. BERNARD, A., PAGET, M. et P. LAMELIN (Lille):
Archives des Maladies de l'Appareil digestif et des
Maladies de la Nutrition 49, 632 (1960).
212. MARS, P.H., PEANASKY, R.J. and M. LASKOWSKI:
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 63, 62 (1946).
213. KALSER, M.H. and M.J. GROSSMAN:
Gastroenterology 26, 189 (1954).
214. WIELAND, T., DUESBERG, P. und H. DETERMANN:
Biochem. Z. 337, 303 (1963).
215. BERGMAYER, H.U.: "Methoden d. enzymat. Analyse",
Verlag Chemie G.m.b.H. Weinheim/Bergstr. 1962.
216. SANGER, F.: Biochem. J. 39, 507 (1945).

Lebenslauf.

Am 31. 7. 1939 wurde ich als Sohn des Regierungsoberinspektors Erich Hartwich und seiner Ehefrau Erna Hartwich, geborene Schröder, in Gelsenkirchen geboren.

Noch im gleichen Jahr zogen wir nach Posen/Warthe, wo wir bis 1945 wohnten. Die Flucht vor den Russen führte meine Mutter, meine beiden Geschwister und mich nach Retzen in Lippe. Mein Vater ist seit dieser Zeit vermißt.

Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Grundschule in Retzen, von 1950 bis 1954 das math. nat. Gymnasium in Bad Salzungen.

Nach unserem Umzug nach Dortmund 1954 kam ich zum dortigen Humboldt- Gymnasium, wo ich 1959 die Reifeprüfung bestand. Bevor ich 1960 mit dem Medizinstudium begann, genügte ich ein Jahr lang meiner Wehrpflicht bei der Bundeswehr.

Die vorklinischen Semester verbrachte ich in München.

Nach einem Semester in Innsbruck und einem weiteren in Freiburg/Br. kehrte ich nach München zurück, wo ich 1965 die ärztliche Prüfung ablegen werde.

Gunther Hartwich

